# UNTERSUCHUNGEN AN DER ENTHÄUTETEN SKELETTMUSKELFASER DES FROSCHES ZUR AKTIVIERBARKEIT DES KONTRAKTILEN SYSTEMS UND ZUR $Ca^{2+}$-FREISETZUNG UND -AUFNAHME DES SARCOPLASMATISCHEN RETICULUMS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
**Rolf Thieleczek**

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0041

# UNTERSUCHUNGEN AN DER ENTHÄUTETEN SKELETTMUSKELFASER DES FROSCHES ZUR AKTIVIERBARKEIT DES KONTRAKTILEN SYSTEMS UND ZUR $Ca^{2+}$-FREISETZUNG UND -AUFNAHME DES SARCOPLASMATISCHEN RETICULUMS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
**Rolf Thieleczek**

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | T-SR-Kopplung | 2 |
| 1.2 | $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR enthäuteter Skelettmuskelfasern | 4 |
| 1.2.1 | $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung | 4 |
| 1.2.2 | Depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung | 9 |
| 1.3 | Regulation der Actin-Myosin-Interaktion | 13 |
| 1.4 | Charakteristik der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-induzierten steady-state-Kontraktion | 16 |
| 1.5 | Ca-Kapazität des SR und Ca-turnover | 21 |
| 1.6 | Ausblick auf die vorliegende Arbeit | 27 |
| 2. | Material und Methoden | 29 |
| 2.1 | Präparation der enthäuteten Skelettmuskelfaser | 29 |
| 2.2 | Versuchsanordnung und -ablauf | 29 |
| 2.2.1 | Versuchsapparatur | 29 |
| 2.2.2 | Vermessung des Präparates und Lösungswechsel | 31 |
| 2.3 | Lösungen | 33 |
| 2.3.1 | Herstellung der Badlösungen | 36 |
| 2.3.2 | Die apparenten Affinitätskonstanten der Liganden der Badlösungen für verschiedene divalente Kationen | 44 |
| 2.3.3 | Experimentelle Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP in physiologischen Lösungen | 49 |
| 2.3.4 | Kontrolle der Ca-Kontamination in EGTA-freien $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen | 56 |
| 3. | Ergebnisse | 62 |
| 3.1 | Aktivierung des kontraktilen Systems der enthäuteten Skelettmuskelfaser mit divalenten Kationen | 62 |
| 3.1.1 | $Ba^{2+}$-induzierte steady-state-Kontraktion (Ba-Aktivierungskurve) | 63 |
| 3.1.2 | Einfluß von $Mg^{2+}$ auf die Ba-Aktivierungskurve | 77 |
| 3.1.3 | Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung | 82 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.1.4 | Einfluß von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung | 91 |
| 3.1.5 | Effekt von Cd- und Ni-Ionen auf den kontraktilen Mechanismus der enthäuteten Muskelfaser | 98 |
| 3.1.6 | Empfindlichkeit des kontraktilen Apparates für verschiedene divalente Kationen | 108 |
| 3.2 | Untersuchungen zur $Ca^{2+}$-Aufnahme und -Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser | 113 |
| 3.2.1 | Abhängigkeit der Coffein-Wirkung auf das SR von der $Ca^{2+}$-Konzentration innerhalb und außerhalb des SR | 117 |
| 3.2.2 | $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration | 123 |
| 3.2.3 | Der Einfluß von $SCN^-$ auf die Coffein-Wirkung auf das SR | 130 |
| 3.2.4 | Die Wirkung von Coffein-ähnlichen Methylxanthinen auf das SR | 134 |
| 3.2.5 | Bestimmung der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Speicherkapazität des SR über eine Analyse des Zeitverlaufs Coffein-induzierter Spannungstransienten | 137 |
| 3.2.6 | Einfluß des pH auf die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR | 161 |
| 4. | Diskussion | 165 |
| 5. | Anhang | 183 |
| 5.1 | Berechnung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP ($Lapp_{Ba}^{ATP}$) in Gegenwart monovalenter physiologischer Kationen | 183 |
| 5.2 | Anwendung von $Lapp_{Ba}^{ATP}$ bei der Zusammenstellung von $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen mit hohen freien Ba-Konzentrationen | 189 |
| 5.3 | Einige Betrachtungen zum Verlauf von Aktivierungskurven isolierter Myofibrillenbündel | 193 |
| 6. | Zusammenfassung | 203 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 206 |

# 1. E I N L E I T U N G

Jede willkürliche Kontraktion der Skelettmuskulatur wird durch eine vom Zentralnervensystem gesteuerte und über motorische Nervenfasern vermittelte kontrollierte Aktivierung der Muskelfasern ausgelöst. Der Mechanismus der neuromuskulären Erregungsübertragung und der Fortleitung des Muskelaktionspotentials über die gesamte Muskelzellmembran (Sarcolemma) ist heute weitgehend aufgeklärt (umfassende Darstellung z.B. bei KATZ, 1966; ZACHAR, 1971; LÜTTGAU & GLITSCH, 1976). Die Frage, wie die am Sarcolemma ablaufenden elektrischen Ereignisse die Muskelkontraktion auslösen, kann jedoch in vielen Einzelheiten noch nicht beantwortet werden. Die Gesamtheit dieser Vorgänge, die als elektro-mechanische Kopplung bezeichnet wird, läßt sich in vier Prozesse einteilen, ohne daß dadurch eine strenge zeitliche Reihenfolge festgelegt ist: (1) Das Muskelaktionspotential wird entlang den Membranen des transversalen Systems (T-Tubuli) ins Innere der Muskelfaser geleitet. (2) Die Depolarisation der T-System-Membran führt zu einer Freisetzung von Ca-Ionen aus dem Sarcoplasmatischen Reticulum (SR), das im Bereich der Triaden über charakteristische Strukturen mit dem T-System in Kontakt steht. (3) Infolge der Bindung der ins Sarcoplasma freigesetzten Ca-Ionen an Regulatorproteine auf dem Actinfilament wird die Hemmwirkung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes auf die Interaktion zwischen Myosin- und Actinfilamenten aufgehoben. Es kommt unter Ausnutzung der Energie des ATP zur Wechselwirkung zwischen diesen beiden Filamenttypen des Myofilamentgitters und dadurch zur Kontraktion. (4) Die Reakkumulation des freigesetzten $Ca^{2+}$ ins SR durch eine $Ca^{2+}$-Transport-ATPase der SR-Membran führt zu einer Erniedrigung der interfilamentären $Ca^{2+}$-Konzentration. Daraus resultiert eine Dissoziation der Ca-Ionen von den Regulatorproteinen und infolgedessen eine Erschlaffung.

An der elektro-mechanischen Kopplung sind zwei intrazelluläre, morphologisch unterscheidbare funktionelle Systeme der Muskelfaser beteiligt, das SR und der kontraktile Apparat. Ein

geeignetes Präparat zur Untersuchung der Eigenschaften dieser Systeme ist die 1954 von NATORI in die Muskelphysiologie eingeführte enthäutete Skelettmuskelfaser (s.u.). Sie besitzt den Vorteil, daß in ihr die intrazellulären funktionellen Systeme in ihrer nativen Struktur erhalten und direkt experimentell beeinflußbar sind. In den folgenden Kapiteln der Einleitung wird eine Übersicht über einzelne Vorgänge während der elektromechanischen Kopplung gegeben. Dabei stehen die an enthäuteten Skelettmuskelfasern ermittelten Ergebnisse im Mittelpunkt.

Das Aktionspotential der Zellmembran der Skelettmuskelfaser wird regenerativ entlang der Membran des T-Systems ins Faserinnere fortgeleitet (COSTANTIN, 1970). Die damit verbundene Depolarisation der Membranen der T-Tubuli ist essentiell für die Aktivierung der Muskelkontraktion in vivo (BASTIAN & NAKAJIMA, 1974). Bei dem sich daran anschließenden Schritt innerhalb der elektro-mechanischen Kopplung kann man zwei Prozesse voneinander unterscheiden, die in engem funktionellem Zusammenhang stehen müssen: die Übertragung des Signals von der T-Tubulus-Membran auf die SR-Membran (T-SR-Kopplung) und die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den terminalen Zisternen des SR.

## 1.1 T-SR-Kopplung

Es ist bis heute noch nicht geklärt, ob die Depolarisation der T-Tubulus-Membran direkt auf die SR-Membran übertragen wird (elektrische Kopplung), oder ob das elektrische Signal bei diesem Vorgang umgewandelt wird. Als gesichert gilt jedoch eine Beteiligung von geladenen Molekülen in der T-Tubulus-Membran (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973) an diesem spannungsabhängigen Schritt. Sie könnten als Sensoren des elektrischen Feldes innerhalb der T-Tubulus-Membran eine entscheidende Rolle bei der strikten Kontrolle der Kontraktion durch das Membranpotential (HODGKIN & HOROWICZ, 1960a) spielen. Nach einer Modellvorstellung von CHANDLER, RAKOWSKI & SCHNEIDER (1976) verursacht die Depolarisation der T-System-Membran eine intramembranale Bewegung solcher Ladungsträger (charge movement). Als Folge davon werden

makromolekulare Kopplungsstrukturen zwischen den Membranen des T-Systems und des SR bewegt oder verändert. Jede Kopplungsstruktur, die mit einem der elektronenmikroskopisch sichtbaren "Füßchen" (FRANZINI-ARMSTRONG, 1980) identisch oder in ihm lokalisiert sein könnte, öffnet direkt einen zugehörigen $Ca^{2+}$-Kanal in der SR-Membran. Da die charge movements eine potentialabhängige Aktivierung und Inaktivierung zeigen, wäre eine Kontrolle des Öffnungszustandes der $Ca^{2+}$-Kanäle der SR-Membran durch das Membranpotential des T-Systems gewährleistet. Gemäß dieser Modellvorstellung ist die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auf die terminale Zisterne - insbesondere auf deren Füßchen - begrenzt. Sie trägt damit Ergebnissen aus elektrophysiologischen (HUXLEY & TAYLOR, 1958) und autoradiographischen Untersuchungen (WINEGRAD, 1965a, b) Rechnung. Alternativ zu diesem Modell sind jedoch auch weniger direkte, durch charge movements induzierte Kopplungsmechanismen denkbar (CHANDLER et al., 1976).

Es gibt einige experimentelle Hinweise dafür, daß die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR mit einer Änderung des SR-Membranpotentials einhergeht, obwohl die Existenz dieses Membranpotentials mit herkömmlichen elektrophysiologischen Techniken nicht direkt nachweisbar ist. So wurden Änderungen in der Fluoreszenz eines potential-sensitiven Farbstoffes (Nile Blue A; BEZANILLA & HOROWICZ, 1975) und Änderungen des Doppelbrechungssignals einer Einzelfaser (BAYLOR & OETLIKER, 1975) während der Aktivierung der Muskelfaser als eine mit der $Ca^{2+}$-Freisetzung assoziierte Änderung des SR-Membranpotentials interpretiert. SUAREZ-KURTZ & PARKER (1977) zeigten jedoch mit Hilfe des $Ca^{2+}$-Indikatorfarbstoffes Arsenazo III, daß die Änderung des Doppelbrechungssignals von der Erhöhung der sarcoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration abhängt und nicht von der $Ca^{2+}$-Freisetzung selbst verursacht wird. Dagegen konnte in elektrophysiologischen Untersuchungen an aus einzelnen Muskelfasern herausgeschnittenen Faserstücken (cut fibres) gezeigt werden, daß das Nile-Blue-A-Signal unabhängig von der sarcoplasmatischen freien Ca-Konzentration ist (VERGARA, BEZANILLA & SALZBERG, 1978). Dieser Befund spricht für eine Änderung des Membranpotentials des SR während

der elektro-mechanischen Kopplung am Skelettmuskel. Auch an der enthäuteten Skelettmuskelfaser wurden mit Hilfe eines potentialsensitiven Farbstoffes Hinweise auf eine Spannungsänderung über der SR-Membran während der $Ca^{2+}$-Freisetzung gefunden (FABIATO & FABIATO, 1977; BEST & FORD, 1978). Wie diese Potentialänderung, an der die gesamte SR-Membran beteiligt ist, mit der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den terminalen Zisternen funktionell zusammenhängt, ist nach wie vor ein ungelöstes Problem.

## 1.2 $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR enthäuteter Skelettmuskelfasern

Der Prozeß der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR ist vor allem an der enthäuteten Skelettmuskelfaser (skinned fibre) untersucht worden. Dieses Präparat, bei dem die Zellmembran einer einzelnen Muskelfaser mechanisch entfernt wird (NATORI, 1954), hat sich als sehr geeignet zur Untersuchung dieses Prozesses erwiesen, weil das Sarcoplasma mit seinen Kompartimenten und funktionellen Systemen direkt für die Badlösung zugänglich wird. Mit Hilfe des Komplexbildners EGTA, der als $Ca^{2+}$-Puffer in physiologischen Lösungen verwendet werden kann (PORTZEHL, CALDWELL & RÜEGG, 1964), konnten geeignete "intrazelluläre" Badlösungen zur Untersuchung des NATORI-Präparates entwickelt werden (HELLAM & PODOLSKY, 1969; ENDO, TANAKA & OGAWA, 1970; FORD & PODOLSKY, 1970). Es zeigte sich, daß in diesem Präparat eine Vielzahl von Stimuli eine Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem SR induzieren kann (vgl. ENDO, 1977). Bei der physiologischen $Ca^{2+}$-Freisetzung im lebenden Skelettmuskel scheinen jedoch nach heutiger Kenntnis nur zwei Mechanismen von Bedeutung zu sein, die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung und die depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung.

### 1.2.1 $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung

Der Nachweis, daß Ca-Ionen selbst eine Ausschüttung von $Ca^{2+}$ aus dem SR auslösen können, wurde zuerst an enthäuteten Skelettmuskelfasern erbracht (FORD & PODOLSKY, 1968; ENDO, TANAKA & EBASHI, 1968). Dieses Konzept der sogenannten regenerativen

oder $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung wurde hauptsächlich mit Hilfe zweier verschiedener experimenteller Ansätze entwickelt und weiter verfolgt: der Untersuchung der Coffein-Wirkung auf das SR (EBASHI, ENDO & OHTSUKI, 1969; ENDO et al., 1970; ENDO, 1975a, b; THORENS & ENDO, 1975) und der Untersuchung der enthäuteten Muskelfaser bei niedrigen $Mg^{2+}$-Konzentrationen (FORD & PODOLSKY, 1970; 1972b). Die in beiden Methoden verwendeten experimentellen Bedingungen werden heute allgemein als für die $Ca^{2+}$-Freisetzung fördernd angesehen (ENDO, 1977; STEPHENSON, 1981a).

Coffein, dessen $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung auf das SR seit langem bekannt ist (WEBER & HERZ, 1968; OGAWA, 1970), wurde von ENDO (1975b) als "erleichternder Faktor" für den Mechanismus der $Ca^{2+}$-Freisetzung klassifiziert, denn mit zunehmender Coffein-Konzentration war eine geringere $Ca^{2+}$-Konzentration in der Badlösung zur Nettofreisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem SR der enthäuteten Faser nötig, während die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR durch Coffein nicht gehemmt wurde. Dieser Befund der $Ca^{2+}$-Abhängigkeit des Coffein-Effektes deutet auf eine direkte Wirkung von Coffein auf den Mechanismus der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung hin, da in Gegenwart von Coffein eine geringere freie Ca-Konzentration bereits zu einem effektiven $Ca^{2+}$-Stimulus für das SR wird. Neuere Untersuchungen des $^{45}Ca$-Effluxes an enthäuteten Muskelfasern bei niedrigen $Mg^{2+}$-Konzentrationen (STEPHENSON, 1979; 1981b) zeigten jedoch, daß Coffein zwei Effekte verursacht: (1) Coffein initiiert unabhängig von $Ca^{2+}$ die Freisetzung einer geringen Menge $Ca^{2+}$ aus dem SR, die sekundär durch den $Ca^{2+}$-abhängigen Freisetzungsmechanismus verstärkt wird; (2) Coffein hemmt die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR.

Eine transiente Spannungsentwicklung enthäuteter Skelettmuskelfasern infolge einer Erniedrigung der freien Mg-Konzentration (FORD & PODOLSKY, 1970; STEPHENSON & PODOLSKY, 1977a) wurde auf eine erleichterte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR unter diesen Bedingungen zurückgeführt (FORD & PODOLSKY, 1972b; STEPHENSON, 1979; 1981b). Erniedrigte man jedoch in diesen Experimenten die

freie Ca -Konzentration der Badlösungen durch Zugabe von 5 mM EGTA, so löste eine Reduktion der freien Mg-Konzentration von 20 µM auf 4 µM keinen Efflux von $^{45}Ca$ aus dem SR mehr aus (STEPHENSON, 1979; 1981b). Die $Mg^{2+}$-Reduktion verursacht also keine Erhöhung der $Ca^{2+}$-Permeabilität der SR-Membran, sondern bewirkt, daß eine geringere lokale $Ca^{2+}$-Konzentration an der SR-Oberfläche zu einem effektiven $Ca^{2+}$-Freisetzungsstimulus wird (STEPHENSON, 1981b). Der Einfluß der freien Mg-Konzentration könnte über den $Ca^{2+}$-Aufnahme-Mechanismus des SR vermittelt werden, der durch eine Reduktion der $Mg^{2+}$-Konzentration gehemmt wird (STEPHENSON & PODOLSKY, 1977a). Daraus könnte indirekt eine Erhöhung der lokalen $Ca^{2+}$-Konzentration resultieren, die zur Stimulation der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR unter diesen Bedingungen beiträgt. Eine direkte Wirkung von $Mg^{2+}$ auf die Rezeptoren des $Ca^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Efflux-Mechanismus (ENDO, 1975a; 1977) kann trotz der offensichtlichen Beeinflussung des $Ca^{2+}$-Aufnahme-Mechanismus jedoch nicht ausgeschlossen werden (STEPHENSON, 1981b).

Die Tatsache, daß in Gegenwart einer niedrigen freien Mg-Konzentration (0,05 mM) weniger als $10^{-5}$ M $Ca^{2+}$ ausreichen, um eine $Ca^{2+}$-Ausschüttung aus dem SR auszulösen (ENDO, 1975a; ENDO & THORENS, 1975), hat zu der Vermutung geführt, daß ein $Ca^{2+}$-sensitiver $Ca^{2+}$-Efflux-Mechanismus in der SR-Membran an der elektro-mechanischen Kopplung in vivo beteiligt sei. Ein regenerativer Mechanismus könnte in der intakten Muskelfaser auf verschiedene Weise verwirklicht sein:

(a) Ca-Ionen könnten die Erregungsübertragung an der Triade vermitteln (FORD & PODOLSKY, 1972b),
(b) eine kleine Erhöhung des $Ca^{2+}$-Efflux könnte sekundär verstärkt werden (ENDO et al., 1970; FORD & PODOLSKY, 1972b),
(c) ein aktivierter $Ca^{2+}$-Efflux-Kanal könnte durch $Ca^{2+}$ kontrolliert werden (STEPHENSON & PODOLSKY, 1978).

Keine dieser Möglichkeiten ist bis heute eindeutig ausgeschlossen worden. Dagegen wurde die generelle physiologische Bedeutung dieses Mechanismus sehr kontrovers diskutiert. Einige Protagonisten der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (ENDO, 1975a,b; 1977; THORENS & ENDO, 1975) sprechen ihr

neuerdings aus folgenden Gründen eine essentielle Bedeutung im lebenden Skelettmuskel ab: (1) Bei einer physiologischen freien Mg-Konzentration von 0,9 mM ist eine so hohe freie Ca-Konzentration ($>10^{-4}$ M) im myofibrillären Raum zur $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR nötig, die in der lebenden Muskelfaser nicht erreicht wird - auch nicht im engen Spaltraum zwischen der terminalen Zisterne und dem T-Tubulus (ENDO, 1977). (2) Das Auftreten der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung ist vom Ladungszustand des SR abhängig (ENDO, 1975a). Für ein maximal mit $Ca^{2+}$ beladenes SR ist eine myofibrilläre freie Ca-Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M zur $Ca^{2+}$-Freisetzung erforderlich. Bei einem physiologischen Ladungszustand des SR, der etwa 1/3 seiner maximalen Ca-Kapazität entspricht (ENDO, 1977), wird sogar mehr als $3 \cdot 10^{-4}$ M $Ca^{2+}$ benötigt. Deshalb wird die Verwirklichung dieses Mechanismus in vivo aus den unter (1) genannten Gründen bezweifelt. (3) Procain, ein spezifischer Inhibitor der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (FORD & PODOLSKY, 1972a; REUBEN, BRANDT & GRUNDFEST, 1974; THORENS & ENDO, 1975), konnte depolarisations-induzierte Kontraktionen (s.u.) von enthäuteten Muskelfasern (THORENS & ENDO, 1975; ENDO, 1977) oder $K^+$-induzierte Kontrakturen an isolierten Muskelfasern (HAINAUT & DESMEDT, 1974) nicht effektiv unterdrücken. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls als Hinweis gegen eine regenerative $Ca^{2+}$-Freisetzung in vivo angesehen (ENDO, 1977). Ein regenerativer $Ca^{2+}$-Freisetzungsmechanismus ist allerdings durchaus mit der unter voltage-clamp-Bedingungen nachgewiesenen potentialabhängigen graduierten Aktivierbarkeit individueller Myofibrillen der Skelettmuskelfaser (COSTANTIN & TAYLOR, 1973) vereinbar, denn ENDO (1975a) konnte eine graduierte $Ca^{2+}$-Nettoausschüttung aus dem SR in Abhängigkeit von der freien Ca-Konzentration, die sie induziert, nachweisen (vgl. auch STEPHENSON, 1981a).

Die skizzierte, auf quantitative Abschätzungen gestützte Argumentation gegen eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung in vivo ist jedoch nicht gänzlich überzeugend. STEPHENSON (1981a) stellte in Frage, ob die in den betreffenden Untersuchungen verwendeten Badlösungen eine hinreichende Kontrolle des ionalen Milieus im Präparat während der Aktivierung des SR gewährleisten

(vgl. auch MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Wenn das nicht der Fall ist, spielen lokale $Ca^{2+}$-Konzentrationen in der Umgebung des SR während des Aktivierungsvorgangs und nicht die nominelle $Ca^{2+}$-Konzentration im Bad die entscheidende Rolle bei der Auslösung einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (STEPHENSON, 1981a). Außerdem scheint dabei nicht allein das Erreichen einer kritischen $Ca^{2+}$-Konzentration an der SR-Oberfläche, sondern auch die Geschwindigkeit, mit der dieser Schwellenwert erreicht wird, von Bedeutung zu sein (MILLER & THIELECZEK, 1977; FABIATO & FABIATO, 1979b). Darüber hinaus könnte die vor kurzem an enthäuteten Fasern entdeckte Hemmung des $Ca^{2+}$-Transports ins SR durch eine Depolarisation der SR-Membran (STEPHENSON, 1978) zu einem hinreichend schnellen und großen Anstieg der $Ca^{2+}$-Konzentration an der Oberfläche des SR beitragen, so daß auch bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration eine regenerative $Ca^{2+}$-Freisetzung auftreten könnte.

Obwohl also das SR der Skelettmuskelfaser unter bestimmten Bedingungen das Phänomen der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung zeigt, bleibt dessen physiologische Bedeutung weiterhin unklar (ENDO, 1977; STEPHENSON, 1981a). Dagegen bestehen aufgrund der umfangreichen Arbeiten von FABIATO & FABIATO (Review, 1979a) an der enthäuteten Herzmuskelzelle kaum noch Zweifel daran, daß ein $Ca^{2+}$-sensitiver $Ca^{2+}$-Efflux-Mechanismus in der SR-Membran an der elektro-mechanischen Kopplung im lebenden Säuger-Herzmuskel beteiligt ist. Für die Ventrikelzelle ist seit langem ein $Ca^{2+}$-Einstrom in die Faser während des Aktionspotentials nachgewiesen, der für die normale Kontraktion wesentlich ist (vgl. LÜTTGAU & GLITSCH, 1976) und als Auslöser für eine regenerative $Ca^{2+}$-Freisetzung in der Ventrikelzelle des adulten Säugers dienen könnte (FABIATO & FABIATO, 1978a). Zwar ist auch am Skelettmuskel unter voltage-clamp-Bedingungen ein vom Membranpotential abhängiger $Ca^{2+}$-Einstrom nachweisbar (SANCHEZ & STEFANI, 1978), er scheint aber nicht als Auslöser für die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR von Bedeutung zu sein, weil auch in $Ca^{2+}$-freien Badlösungen noch über lange Zeiträume hinweg Zuckungen durch elektrische Reizung auslösbar sind (LÜTTGAU &

SPIECKER, 1979).

### 1.2.2 Depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung

Der zweite Mechanismus, der heute im Zusammenhang mit einer physiologischen $Ca^{2+}$-Ausschüttung aus dem SR diskutiert wird, ist die Aktivierung der $Ca^{2+}$-Freisetzung durch eine Depolarisation der SR-Membran. NATORI (1954, 1975) und COSTANTIN & PODOLSKY (1967) demonstrierten an enthäuteten Skelettmuskelfasern in Paraffinöl, daß Strompulse geringer Amplitude langsam fortschreitende Kontraktionen auslösen können. Diese lokalen Kontraktionen und folglich die $Ca^{2+}$-Ausschüttung aus dem SR wurden auf eine Depolarisation der longitudinalen SR-Membranen zurückgeführt, denn die Membranen der transversalen Tubuli werden durch das in Längsrichtung applizierte elektrische Feld nicht hinreichend depolarisiert (COSTANTIN & PODOLSKY, 1967). Nach einer Vorinkubation der intakten Faser in einer die Zellmembran depolarisierenden Lösung verschwinden diese elektrisch auslösbaren Kontraktionen in der enthäuteten Muskelfaser (NATORI, 1965; COSTANTIN & PODOLSKY, 1967). Dieser Befund spricht dafür, daß eine durch die elektrische Reizung ausgelöste Depolarisation der Membranen des longitudinalen T-Systems (PEACHEY & EISENBERG, 1978) und nicht des SR die Ursache für diese Kontraktionen ist.

Während bei einer enthäuteten Muskelfaser in Öl eine Kontraktion durch adäquate elektrische Reizung ausgelöst werden kann, ist dies in wäßriger Lösung praktisch unmöglich. Der einzige Weg, um hier direkt und effektiv das SR-Membranpotential zu ändern, besteht in einer schnellen und kontrollierten Änderung der ionalen Zusammensetzung der Badlösung, die das SR umgibt. Wenn z.B. ein weniger permeables Anion (z.B. Methansulfonat, Sulfat, Gluconat oder Propionat) durch ein vermutlich besser permeables Anion, wie z.B. $Cl^-$, ersetzt wird (Cl-Substitution), sollte sich das Potential der SR-Membran derart ändern, daß das SR-Lumen negativer wird im Vergleich zum myofibrillären Raum. Eine Potentialänderung in dieser Richtung, die von ENDO & NAKAJIMA

(1973) als "Depolarisation" bezeichnet wurde, kann auch erreicht werden, wenn ein gut permeables Kation, wie z.B. $K^+$, durch ein wahrscheinlich schlechter permeables Kation (z.B. $Na^+$, $Li^+$, $Tris^+$ oder $Cholin^+$) ersetzt wird (K-Substitution). Die hier angegebene Sequenz der Permeabilitäten der SR-Membran entspricht weitgehend den an isolierten SR-Vesikeln gemessenen relativen Permeabilitäten dieser Substanzen (MEISSNER & McKINLEY, 1976).

COSTANTIN & PODOLSKY (1966, 1967) zeigten durch Applikation von Tröpfchen wäßriger Lösung auf enthäutete Fasern in Öl, daß sowohl die Cl- als auch die K-Substitution zu ähnlichen transienten lokalen Kontraktionen führt wie die Applikation von Strompulsen; sie schlossen daraus auf einen gemeinsamen Wirkort dieser Stimuli. Auch mit geeigneten intrazellulären Badlösungen wurde der Nachweis erbracht, daß die Cl-Substitution zu einer Kontraktion der enthäuteten Skelettmuskelfaser führt (FORD & PODOLSKY, 1970; FORD, SPOTNITZ & SONNENBLICK, 1970; THORENS & ENDO, 1975; MATSUBARA, SAKAI & HASHIZUME, 1977; MOBLEY, 1979). In diesen enthäuteten Fasern hätten allerdings nicht nur die SR-Membranen, sondern auch die bei der Enthäutung zerrissenen T-Tubuli die Sensoren der ionalen Stimulation sein können. Verschließen sich nämlich die Öffnungen der T-Tubuli wieder, so kann durch einen aktiven Na-Transport deren Membranpotential und damit ihre Erregbarkeit wiederhergestellt werden (NATORI, 1965; COSTANTIN & PODOLSKY, 1967). Jedoch reagieren auch partiell enthäutete Skelettmuskelfasern, in denen das T-System noch mit der Badlösung kommuniziert, auf derartige ionale Substitutionen mit einer Kontraktion (ENDO & NAKAJIMA, 1973). Da in diesem Präparat durch die ionale Änderung der Badlösung wahrscheinlich selektiv das SR-Membranpotential geändert wird, darf man annehmen, daß die Depolarisation der SR-Membran eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR induzieren kann. Permeabilitätsuntersuchungen an isolierten SR-Vesikeln führten zu der These, daß ein osmotisch bedingtes Anschwellen die eigentliche Ursache für die der Depolarisation zugeschriebene $Ca^{2+}$-Freisetzung ist (MEISSNER & McKINLEY, 1976). An enthäuteten Skelettmuskelfasern konnte jedoch auch bei konstantem [K]x[Cl]-Produkt eine $Ca^{2+}$-

Freisetzung durch Cl-Substitution induziert werden, so daß das Diffusionspotential selbst eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR induzieren kann (MOBLEY, 1979).

Der direkte Nachweis einer $Ca^{2+}$-Ausschüttung aus dem SR infolge einer kontrollierten Änderung des ionalen Milieus an der SR-Außenseite wurde mit Hilfe des $Ca^{2+}$-sensitiven Photoproteins Aequorin (ENDO & BLINKS, 1973) und in Untersuchungen der Cl-stimulierten $^{45}Ca$-Freisetzung (STEPHENSON & PODOLSKY, 1977b; STEPHENSON, 1978) an enthäuteten Muskelfasern erbracht.

Basierend auf eigenen Untersuchungen an enthäuteten Muskelfasern des Krallenfrosches (Xenopus leavis) sind die wesentlichen Eigenschaften der depolarisations-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung von ENDO (1977) folgendermaßen charakterisiert worden: (1) Die $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung aus dem SR ist um so größer, je höher die Cl-Konzentration der stimulierenden Badlösung ist (THORENS & ENDO, 1975). (2) Die durch Cl-Substitution induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung ist unabhängig von $Ca^{2+}$ (ENDO & NAKAJIMA, 1973; THORENS & ENDO, 1975) und wird nur unwesentlich von der freien Mg-Konzentration beeinflußt (THORENS & ENDO, 1975). (3) Die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR wird durch die Depolarisation der SR-Membran nicht wesentlich reduziert (FORD, SPOTNITZ & SONNENBLICK, 1970; ENDO & NAKAJIMA, 1973). (4) Der $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR hat keine wesentliche Bedeutung für die depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung (THORENS & ENDO, 1975). (5) Procain hat keine hemmende Wirkung auf die depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung (THORENS & ENDO, 1975). Diese Zusammenstellung von Befunden zeigt, daß sich die depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung offenbar in vielen Merkmalen von der bereits dargestellten $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung unterscheidet. Aufgrund dieser Differenzen schloß ENDO (1977), daß der Prozeß der regenerativen $Ca^{2+}$-Freisetzung essentiell unabhängig von der depolarisations-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung ist und deshalb möglicherweise mehr als nur ein Mechanismus der $Ca^{2+}$-Freisetzung im SR existiert.

Neuere Untersuchungen der Cl-stimulierten $^{45}Ca$-Freisetzung an enthäuteten Froschmuskelfasern (Rana pipiens und berlandieri) widersprechen jedoch den Punkten (2) und (3) der obigen Zusammenstellung. So fanden STEPHENSON & PODOLSKY (1977b), daß die Cl-induzierte $^{45}Ca$-Nettofreisetzung durch eine Erhöhung der $Mg^{2+}$-Konzentration gehemmt wird. Eine Hemmung der $Ca^{2+}$-stimulierten SR-ATPase durch $Cd^{2+}$ oder Temperaturerniedrigung (MacLENNAN & HOLLAND, 1975) wirkte antagonistisch zu diesem $Mg^{2+}$-Effekt, was auf eine Beeinflussung der $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung durch den $Mg^{2+}$-abhängigen $Ca^{2+}$-Transport ins SR deutet. In Gegenwart von 5 mM ECTA verursacht die Cl-Substitution keine Stimulation des $^{45}Ca$-Efflux und keine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR (STEPHENSON, 1978). Man muß deshalb annehmen, daß die depolarisations-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung von $Ca^{2+}$ abhängig ist. Eine detaillierte Untersuchung der EGTA-Wirkung bei Applikation zu verschiedenen Zeiten der Cl-Substitution führte zu der Hypothese, daß die Depolarisation der SR-Membran sowohl direkt den $Ca^{2+}$-Efflux stimuliert als auch den aktiven $Ca^{2+}$-Transport ins SR hemmt, so daß die $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung aus dem SR durch diese beiden Prozesse bestimmt wird (STEPHENSON, 1978).

Die offensichtliche $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der beiden diskutierten $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozesse könnte einen Hinweis darauf geben, daß die ihnen zugrundeliegenden Mechanismen nicht unabhängig voneinander sind, wie von ENDO (1977) behauptet wurde, sondern in wechselseitiger Beziehung zueinander stehen. Zum Beispiel könnten Ca-Ionen eine $Ca^{2+}$-Freisetzung induzieren, indem sie die SR-Membran depolarisieren, oder eine Depolarisation könnte einen kleinen $Ca^{2+}$-Efflux initiieren, der über den $Ca^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Freisetzungsmechanismus verstärkt wird. Ein Problem stellt allerdings die Tatsache dar, daß weder die ionale Zusammensetzung noch die Permeabilitäten des SR auf die Existenz eines SR-Ruhemembranpotentials hinweisen (SOMLYO, SHUMAN & SOMLYO, 1977).

## 1.3 Regulation der Actin-Myosin-Interaktion

Die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR während der Muskelaktivierung führt zu einer Erhöhung der interfilamentären freien Ca-Konzentration von $\lesssim 2 \cdot 10^{-7}$ M auf ca. $5 \cdot 10^{-6}$ M (BLINKS, RÜDEL & TAYLOR, 1978). In allen bisher untersuchten Muskeln kontrolliert die interfilamentäre $Ca^{2+}$-Konzentration die Kontraktion durch Aufhebung der Hemmung der Actin-Myosin-Interaktion (EBASHI et al., 1969; WEBER & MURRAY, 1973). Entgegen der ursprünglichen Ansicht ist das Troponin-Tropomyosin-System jedoch nicht das einzige Regulationssystem der Muskelkontraktion, das sich im Laufe der Evolution ausgebildet hat (EBASHI, 1980). Der $Ca^{2+}$-abhängige Regulationsmechanismus kann je nach Tierart und Muskeltyp im Troponin-Tropomyosin-Komplex des Actins (Actinregulation), im Myosin (Myosinregulation) oder in beiden (Actin-Myosin-Regulation) lokalisiert sein (LEHMAN & SZENT-GYÖRGYI, 1975; ADELSTEIN & EISENBERG, 1980). Die Regulation der Kontraktion der Vertebraten-Skelettmuskulatur erfolgt hauptsächlich durch einen actingebundenen Regulationsmechanismus, obwohl nach neueren Erkenntnissen eine simultane Myosinregulation nicht ausgeschlossen werden kann (vgl. ADELSTEIN & EISENBERG, 1980).

Die Einheit des actingebundenen Regulationsmechanismus besteht aus vier Proteinen: Tropomyosin (TM) und den drei Troponinen TN-T, TN-C und TN-I, die zusammen den Troponin-Komplex bilden, der an einer bestimmten Stelle des TM-Moleküls gebunden ist (WEBER & MURRAY, 1973). In jeder der beiden "Rillen" der Actin-Doppelhelix liegt ein aus diesen Einheiten aufgebautes Tropomyosinfilament, das die Actin-Myosin-Interaktion reguliert. Die Konformation und Position des TM-TN-Komplexes auf dem Actinfilament ist variabel und hängt vom $Ca^{2+}$-Gehalt des Troponins ab. Sie kontrolliert die Reaktionsfähigkeit von je 7 Actin-Monomeren mit einem Myosinköpfchen, die zusammen die funktionelle Einheit des Kontraktionsmechanismus darstellen. Wahrscheinlich wird die Actin-Myosin-Interaktion nicht direkt über eine sterische Hemmung durch den TM-TN-Komplex reguliert, wie ursprünglich angenommen wurde (HASELGROVE, 1973; HUXLEY, 1973;BREMEL, MURRAY & WEBER, 1973), sondern indirekt über eine Konformationsänderung der Actin-Monomeren (SEYMOUR & O'BRIEN, 1980).

Eine Bindung von Ca-Ionen an TN-C verändert die inhibitorische Konformation des TM-TN-Komplexes derart, daß ein cyclisches Anheften und Lösen von Myosinköpfchen (Querbrücken) am Actinfilament auftreten kann (Querbrückencyclus).Gleichzeitig aktiviert Actin die ATP-Hydrolyse durch die in den Myosinköpfchen lokalisierte Myosin-ATPase (WEBER & MURRAY, 1973). Dieser Prozeß liefert die Energie für die asynchrone, cyclische physikalische Aktivität der Querbrücken, die als voneinander unabhängige Generatoren der Kraft angesehen werden (HUXLEY, 1974). Die physikalische Veränderung der Querbrücke im Querbrückencyclus, die die Spannungsentwicklung zwischen den beiden Filamenttypen verursacht, verläuft wahrscheinlich über mehrere diskrete Stufen, wobei die Geschwindigkeitskonstanten für das Anheften und Lösen jeder Querbrücke von den relativen Positionen des Myosinköpfchens und der Actinbindungsstelle abhängig sind (HUXLEY & SIMMONS, 1971; HUXLEY, 1974). Die ursprüngliche Hypothese, daß das Anheften und Lösen einer Querbrücke ein alles-oder-nichts-Phänomen ist (HUXLEY, 1957), wird heute von einigen Autoren zugunsten eines reversiblen Reaktionsmechanismus abgelehnt, nicht nur hinsichtlich der biochemischen Reaktionen (vgl. EISENBERG & GREENE, 1980), sondern auch in bezug auf die physikalischen Prozesse im Querbrückencyclus (ADELSTEIN & EISENBERG, 1980). Nach dieser Vorstellung stellt der Regulationsmechanismus der Kontraktion ein sehr empfindlich ausbalanciertes System dar, in dem $Ca^{2+}$ nicht nur das Gleichgewicht zwischen angehefteten und gelösten Querbrücken kontrolliert, sondern umgekehrt dieses Gleichgewicht auch die $Ca^{2+}$-Bindung an TN-C beeinflußt.

Das $Ca^{2+}$-sensitive Protein TN-C des TN-Komplexes des Skelettmuskels besitzt 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen, die für eine Gruppe von $Ca^{2+}$-bindenden Proteinen, zu der auch Parvalbumin und Calmodulin gehören, charakteristisch sind (COLLINS, GREASER, POTTER & HORN, 1977). Beginnend am Amino-Ende des Moleküls, dessen Aminosäuresequenz bekannt ist (COLLINS et al., 1977), können die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen mit I-IV durchnumeriert werden. Die Bindungsplätze I und II ($Ca^{2+}$-specific sites) binden spezifisch $Ca^{2+}$ mit einer Bindungskonstanten von $\approx 3 \cdot 10^5\ M^{-1}$; III und IV binden sowohl $Ca^{2+}$ als auch $Mg^{2+}$ ($Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites) mit Affinitätskon-

stanten von $\approx 2 \cdot 10^7$ $M^{-1}$ für $Ca^{2+}$ und $5 \cdot 10^3$ $M^{-1}$ für $Mg^{2+}$. Zusätzlich besitzt TN-C zwei $Mg^{2+}$-spezifische Bindungsstellen ($Mg^{2+}$-specific sites) mit einer Bindungskonstanten von $\approx 3 \cdot 10^3$ $M^{-1}$ (POTTER & GERGELY, 1975; LEAVIS, ROSENFELD, GERGELY, GRABAREK & DRABIKOWSKI, 1978).
Die Bindungskonstanten von TN-C im TN-Komplex sind alle etwa 10-mal größer als die oben angegebenen Werte für das isolierte TN-C (POTTER & GERGELY, 1975). Einige Autoren nehmen an, daß nur die $Ca^{2+}$-spezifischen Bindungsplätze für die Regulation der Actomyosin-ATPase-Aktivität und Kontraktion von Bedeutung sind, weil die $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites unter physiologischen Bedingungen von $Mg^{2+}$ besetzt sein dürften (POTTER & GERGELY, 1975) und nur die $Ca^{2+}$-specific sites hinreichend schnell mit der sarcoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration äquilibrieren, um die Geschwindigkeit von Kontraktion und Erschlaffung der intakten Muskelfaser erklären zu können (JOHNSON, CHARLTON & POTTER, 1979). Die anderen Bindungsplätze sind nach dieser Vorstellung möglicherweise für die Aufrechterhaltung funktionsfähiger Konformationen des TN-Komplexes wichtig (POTTER & GERGELY, 1975). Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß die $Ca^{2+}$-specific sites nicht qualitativ verschieden sind von den $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites (c.f. EBASHI, 1980) und daß alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsplätze am Regulationsprozeß beteiligt sind (BREMEL & WEBER, 1972; KOHAMA, 1980).

Obwohl der Skelettmuskel Myosin-phosphorylierende Systeme besitzt (Myosin-light-chain-kinase, Calmodulin, Myosin-light-chain-phosphatase), scheint hier die Phosphorylierung spezifischer Untereinheiten des Myosinköpfchens (regulatory light chains) durch diese Enzyme im Gegensatz zum glatten Muskel keine bedeutsame Rolle bei der Regulation der Kontraktion zu spielen, da sie keinen wesentlichen Effekt auf die actin-aktivierte Myosin-ATPase-Aktivität verursacht (PERRY, 1979; STULL, MANNING, HIGH & BLUMENTHAL, 1980). Eine Myosin-Phosphorylierung, die in vivo während einer tetanischen Reizung auftritt, könnte allerdings an der Modulation der Kraftentwicklung des Skelettmuskels beteiligt sein (BARANY, BARANY, GILLIS & KUSHMERICK, 1979;

MANNING & STULL, 1979). Dagegen ist der zweite, bisher nur bei Mollusken gefundene Typ der Myosinregulation - die Regulation der Actomyosin-ATPase-Aktivität durch eine Bindung von $Ca^{2+}$ an Myosin - möglicherweise auch bei der Skelettmuskulatur zusätzlich zur Actinregulation vorhanden (MOISESCU, 1976; LEHMAN, 1978; GRABAREK, GERGELY & LEAVIS, 1981). Die Tatsache, daß TN-I und TN-T des Skelettmuskels durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase und/oder Phosphorylasekinase phosphoryliert werden können, hat zu der Vermutung geführt, daß diese Phosphorylierungen bei der Regulation der Skelettmuskelkontraktion eine Rolle spielen. In-vitro-Untersuchungen mit phosphorylierten und dephosphorylierten Troponin-Komponenten haben jedoch keinerlei Beeinflussung der $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der actin-aktivierten Myosin-ATPase durch diese experimentellen Bedingungen ergeben (PERRY, 1979; STULL, MANNING, HIGH & BLUMENTHAL, 1980).

### 1.4 Charakteristik der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-induzierten steady-state-Kontraktion

Die physikochemischen Eigenschaften des kontraktilen Mechanismus des Skelettmuskels, insbes. die ionale Abhängigkeit der Spannungsentwicklung, sind zum großen Teil in Aktivierungsexperimenten an enthäuteten Fasern mit definierten $Ca^{2+}$-gepufferten Badlösungen untersucht worden. Die relative isometrische steady-state-Spannung enthäuteter Skelettmuskelfasern in Abhängigkeit von der applizierten freien Ca-Konzentration (Ca-Aktivierungskurve) zeigt einen sigmoiden Verlauf. Diese Aktivierungskurve kann nach einem Kriterium von MOISESCU, ASHLEY & CAMPBELL (1975) durch einen "Hill-Koeffizienten" (n) charakterisiert werden, der die Steilheit der Aktivierungskurve beschreibt und die Mindestanzahl von Ionen angibt, die pro funktioneller Einheit des Kontraktionsmechanismus am Prozeß der Spannungsentwicklung beteiligt sind. Je nach den verwendeten experimentellen Bedingungen sind für den Skelettmuskel $Ca^{2+}$-Aktivierungskurven mit einem Hill-Koeffizienten von n=2 (HELLAM & PODOLSKY, 1969; GODT, 1974; DONALDSON & KERRICK, 1975), n=3-4 (JULIAN, 1971; BRANDT, REUBEN & GRUNDFEST, 1972; MOISESCU, 1976; ORENTLICHER,

BRANDT & REUBEN, 1977; FABIATO & FABIATO, 1978b; MOISESCU & THIELECZEK, 1979; ROBERTSON & KERRICK, 1979), und n=5-6 (BRANDT, Cox & KAWAI, 1980) ermittelt worden. Die myofibrilläre ATPase-Aktivität zeigt etwa die gleiche Abhängigkeit von der freien Ca-Konzentration wie die $Ca^{2+}$-Bindung an TN-C (POTTER & GERGELY, 1975). Im Gegensatz dazu verlaufen die durch eine kooperative Wirkung von mehr als 2 Ca-Ionen charakterisierbaren Aktivierungskurven der isometrischen Spannung (n>2, s.o.) beträchtlich steiler als diese $Ca^{2+}$-Bindungskurve, so daß die Spannungsentwicklung nicht einfach proportional zu der an das Regulationssystem gebundenen Menge an $Ca^{2+}$ ist (LÜTTGAU & MOISESCU, 1978). Aus einer quantitativen Analyse der Kinetik der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung enthäuteter Froschmuskelfasern wurde von MOISESCU (1976) ein Modell entwickelt, das die beiden Phänomene, $Ca^{2+}$-Bindung und Kraftentwicklung, miteinander in Beziehung setzt. Danach binden pro funktioneller Einheit des Kontraktionsapparates insgesamt 6 Ca-Ionen unabhängig voneinander an 2 Einheiten des Kontraktionsmechanismus, die 2 bzw. 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen besitzen und vermutlich mit dem Myosinmokekül bzw. dem TN-Komplex identisch sind. Die Menge des an den Regulationsmechanismus gebundenen $Ca^{2+}$ ist dann proportional zu der Summe der an jeder Einheit gebundenen Ca-Ionen, während die Kraft proportional zum Produkt der relativen Konzentrationen der mit $Ca^{2+}$ gesättigten Einheiten ist. Diese Vorstellung impliziert, daß die Bindung von 2 Ca-Ionen an das Myosinmolekül bei der Regulation der Skelettmuskelkontraktion von Bedeutung ist, wofür es seit kurzem auch biochemische Hinweise gibt (LEHMAN, 1978; GRABAREK et al., 1981).

Die Steilheit und die Position der Ca-Aktivierungskurve auf der pCa-Achse ist von den ionalen Bedingungen abhängig, unter denen die Aktivierung der enthäuteten Skelettmuskelfaser stattfindet (vgl. ASHLEY, 1978). So wird die pCa-Spannung-Kurve zu höheren freien Ca-Konzentrationen verschoben, wenn die Konzentration an K-Ionen (MOISESCU, 1975; ASHLEY & MOISESCU, 1977) oder die Protonen-Konzentration (ASHLEY & MOISESCU, 1974; 1977; ROBERTSON & KERRICK, 1979) der Badlösung erhöht wird. Dagegen verursacht

eine Temperaturerniedrigung von +20 auf +4 °C oder eine Variation der Ionenstärke der Badlösung keine signifikante Verschiebung oder Veränderung der Beziehung zwischen relativer Spannung und pCa (ASHLEY & MOISESCU, 1977). Die absolute Spannung wird jedoch durch die Temperaturerniedrigung um mehr als 50 % reduziert (ASHLEY & MOISESCU, 1977).

Eine Erhöhung der freien Mg-Konzentration führt ebenfalls zu einer Verschiebung der Ca-Aktivierungskurve zu höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen, wobei die maximale isometrische steady-state-Spannung nicht verändert wird (EBASHI et al., 1969; ASHLEY & MOISESCU, 1974; 1977; DONALDSON & KERRICK, 1975). Diese $Mg^{2+}$-abhängige Verschiebung der Ca-Aktivierungskurve kann durch eine kompetitive Hemmung der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung durch $Mg^{2+}$ erklärt werden (DONALDSON & KERRICK, 1975) und läßt eine Beteiligung der $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites des TN-C an der Regulation der Kontraktion vermuten. Interessanterweise wird die $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der myofibrillären ATPase-Aktivität nicht durch die freie Mg-Konzentration beeinflußt (POTTER & GERGELY, 1975; GRABAREK et al., 1981). Diese offensichtliche Diskrepanz zwischen der mechanischen und der ATPase-Aktivität der kontraktilen Einheit stellt ein ungelöstes Problem dar, wenn auch bei hohen $Mg^{2+}$-Konzentrationen (5-10 mM) analog zur Spannungsentwicklung eine Beeinflussung der $Ca^{2+}$-abhängigen myofibrillären ATPase-Aktivität durch $Mg^{2+}$ gefunden wurde (SOLARO & SHINER, 1976).

Einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften des kontraktilen Mechanismus haben Aktivierungsexperimente an enthäuteten Skelettmuskelfasern mit "unphysiologischen" divalenten Kationen geliefert.Aus den ersten Injektionsexperimenten zur direkten Aktivierung des kontraktilen Apparates von Skelettmuskelfasern von Vertebraten (HEILBRUNN & WIERCINSKI, 1947) und Invertebraten (CALDWELL & WALSTER, 1963) ist bekannt, daß $Sr^{2+}$ und $Ba^{2+}$ den physiologischen Aktivator $Ca^{2+}$ im Kontraktionsprozeß ersetzen können. Diese ersten Befunde sind jedoch aus zwei Gründen nicht eindeutig interpretierbar: (1) Für die Injektionen wurden ungepuffer-

te Chloridlösungen dieser Substanzen verwendet, so daß die Gefahr der $Ca^{2+}$-Kontamination relativ groß war. (2) Die injizierten divalenten Kationen hätten eine Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem SR oder von sarcoplasmatischen Bindungsstellen ausgelöst haben können. In beiden Fällen wäre die Kontraktion zumindest partiell durch $Ca^{2+}$ verursacht worden.

Neuere Aktivierungsexperimente an enthäuteten Muskelfasern mit EGTA-gepufferten $Sr^{2+}$-Lösungen haben ergeben, daß das kontraktile System durch $Sr^{2+}$ aktivierbar ist. $Sr^{2+}$ kann in enthäuteten Skelettmuskelfasern von Vertebraten 90-100 % der maximalen mit $Ca^{2+}$ induzierbaren Spannung auslösen (DONALDSON & KERRICK, 1975; MOISESCU & THIELECZEK, 1979; KERRICK, MALENCIK, HOAR, POTTER, COBY, POCINWONG & FISCHER, 1980). Um jedoch mit $Sr^{2+}$ dieselbe relative isometrische Spannung auszulösen wie mit $Ca^{2+}$, ist eine um den Faktor 5 (DONALDSON & KERRICK, 1975; KERRICK et al., 1980) bzw. 25 (MOISESCU & THIELECZEK, 1979) höhere Konzentration an $Sr^{2+}$ als an $Ca^{2+}$ nötig. Dieser Befund kann mit der deutlich höheren Affinität der Regulatorproteine des Kontraktionsmechanismus für $Ca^{2+}$ als für $Sr^{2+}$ (EBASHI et al., 1969) erklärt werden. Die Steilheit der Sr-Aktivierungskurve ist identisch mit der der jeweils unter denselben experimentellen Bedingungen ermittelten Ca-Aktivierungskurve (DONALDSON & KERRICK, 1975; MOISESCU & THIELECZEK, 1979; KERRICK et al., 1980), was darauf hindeutet, daß die Sr-Ionen an denselben zur Kraftentwicklung führenden Reaktionsschritten beteiligt sind wie die Ca-Ionen.

Ein interessanter Unterschied zu der qualitativ gleichen Wirkung von $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ am Skelettmuskel der Vertebraten ist beim Crustaceen-Skelettmuskel gefunden worden. Dort kann $Sr^{2+}$ an der frisch enthäuteten Muskelfaser nur 0-10 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten isometrischen Spannung auslösen (MOISESCU & THIELECZEK, 1978b; STEPHENSON & WILLIAMS, 1980). Darüber hinaus verläuft die Ca-Aktivierungskurve in Gegenwart von $Sr^{2+}$ bei höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen flacher (STEPHENSON & WILLIAMS, 1980). Beide Ergebnisse lassen sich erklären, wenn $Sr^{2+}$ zwar an

alle $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Regulationsmechanismus gebunden wird, aber nur einen Teil von ihnen auch "aktivieren" kann (STEPHENSON & WILLIAMS, 1980).

Über die $Ba^{2+}$-abhängige Aktivierung des Kontraktionsmechanismus der Skelettmuskelfaser existieren, abgesehen von den bereits erwähnten Arbeiten, keine quantitativen Untersuchungen. In einer neueren Arbeit zeigten MATSUMURA & MASHIMA (1976), daß iontophoretisch in einzelne Crustaceen-Skelettmuskelfasern injizierte Ca-, Sr- und Ba-Ionen vergleichbare lokale Kontraktionen auslösen. Jedoch war die vom Rheobase-Strom in die Zelle transportierte, zur Auslösung einer Schwellen-Kontraktion nötige Menge an $Ba^{2+}$ relativ zu $Ca^{2+}$ viel kleiner (Ba/Ca = 3/1), als es nach der relativen Sensitivität des kontraktilen Systems des Kaninchen-Skelettmuskels für diese Ionen (Ba/Ca = 1/600) erwartet worden wäre (EBASHI et al., 1969). Ein indirekter Effekt von $Ba^{2+}$ über die Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus intrazellulären Speichern kann also auch in diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden. Ein indirekter Hinweis auf eine Aktivierbarkeit des kontraktilen Apparates durch $Ba^{2+}$ ergibt sich bei einer Verknüpfung der zitierten Befunde von MATSUMURA & MASHIMA (1976) mit Ergebnissen von SUAREZ-KURTZ & SORENSON (1979). Letztere zeigten, daß in Ca-freien Lösungen $Ba^{2+}$-Aktionspotentiale in isolierten Crustaceen-Muskelfasern keine Kontraktion auslösen können. Das durch den $Ba^{2+}$-Influx während des Aktionspotentials gegebene Signal führt also nicht zu einer $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR. Eine Kontraktion als Folge einer $Ba^{2+}$-Injektion (s.o.) spiegelt somit wahrscheinlich eine $Ba^{2+}$-induzierte Aktivierung des kontraktilen Systems wider.

Für eine Aktivierbarkeit des kontraktilen Mechanismus durch $Ba^{2+}$ spricht möglicherweise auch eine $Ba^{2+}$-abhängige Aktivierbarkeit der Skelettmuskel-Actomyosin-ATPase im Bereich von $10^{-4}$ - $10^{-3}$ M $Ba^{2+}$ (BERSON, 1974). $Ba^{2+}$ ähnelt in dieser Hinsicht $Cd^{2+}$, von dem bekannt ist, daß es ebenfalls die TN-kontrollierte Actomyosin-ATPase aktivieren kann (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972). FUCHS (1974) fand in Bindungsuntersuchungen

der $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites des Troponins, daß diese Klasse von Bindungsstellen Ionen nach ihrer Größe und Ladung selektiert, wobei divalente Kationen von der Größe des Ca-Ions (Ionenradius 0,99 Å) bevorzugt werden. Aufgrund der beobachteten hohen Affinität von $Cd^{2+}$ für Troponin, des Ionenradius von $Cd^{2+}$ von 0,97 Å und der Ergebnisse von HARTSHORNE & BOUCHER (1972) vermutete FUCHS (1974), daß $Ca^{2+}$ in der Aktivierung der Kontraktion durch $Cd^{2+}$ ersetzt werden kann. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte die Frage beantworten, ob eine signifikante Bindung von Kationen an die Bindungsstellen des Regulationsmechanismus und die simultane Aktivierung der actinregulierten Myosin-ATPase-Aktivität eine hinreichende Voraussetzung zur Aktivierung der Kontraktion darstellt (FUCHS, 1974; HARTSHORNE & BOUCHER, 1974).

### 1.5 Ca-Kapazität des SR und Ca-turnover

Für die Skelettmuskelfaser ist ein Troponin-Gehalt in der Größenordnung von 70 µmol/l Faser (EBASHI et al., 1969) bis 120 µmol/l Faser (WEBER & MURRAY, 1973; MARSTON, 1973; unter Annahme eines molaren Verhältnisses von Myosin:Troponin = 1:1) ermittelt worden. Legt man eine Bindung von Ca-Ionen an alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Troponins zugrunde, so muß die Ca-Gesamtkonzentration im Sarcoplasma während der Aktivierung der Skelettmuskelfaser auf etwa 0,28 - 0,48 mM ansteigen, um das kontraktile System maximal zu aktivieren. Diese Werte stellen Mindestkonzentrationen dar, da die Ca-Bindungskapazität des Myosins (EBASHI et al., 1969; WEBER & MURRAY, 1973; MARSTON, 1973) und der Muskel-Parvalbumine (PECHERE, 1977; GOSSELIN-REY & GERDAY, 1977) die $Ca^{2+}$-Menge, die zur Aktivierung der Kontraktion aus dem SR ins Sarcoplasma freigesetzt werden muß, noch erhöht. Die Parvalbumine - kleine lösliche Proteine homolog zu TN-C mit einer $Ca^{2+}$-spezifischen und einer $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Bindungsstelle mit Affinitäten ähnlich wie TN-C (PECHERE, 1977) - könnten als intrazelluläre $Ca^{2+}$-Puffer indirekt an der Regulation der Kontraktion beteiligt sein (GILLIS & GERDAY, 1977).

Das SR der lebenden Skelettmuskelfaser, das die zur Aktivierung der Kontraktion benötigte Menge an $Ca^{2+}$ (s.o.) innerhalb einiger msec bereitstellen muß, hat eine maximale Ca-Kapazität von etwa 160 - 200 nmol Ca/mg SR-Protein (WEBER, HERZ & REISS, 1966; OGAWA, 1970). Diese Werte wurden ohne eine Verwendung von die $Ca^{2+}$-Aufnahme stimulierenden Substanzen, wie z.B. Oxalat (HASSELBACH & MAKINOSE, 1961), an SR-Vesikeln des Froschskelettmuskels ermittelt. Mit Hilfe der Relation zwischen dem Volumen und der Protein-Konzentration der SR-Vesikel von 10 µl SR/mg SR-Protein (WEBER, HERZ & REISS, 1963; 1966) ergeben diese Daten eine Ca-Gesamtkonzentration im SR von 16 - 20 mM. Das SR enthäuteter Skelettmuskelfasern des Frosches kann etwa 2 - 3 µmol Ca/ml Muskel akkumulieren (FORD & PODOLSKY, 1972a). Da der Frosch-Skelettmuskel etwa 90 - 130 µl SR pro ml Muskel enthält (PEACHEY, 1965; OGAWA, 1970; MOBLEY & EISENBERG, 1975), entspricht das einer Ca-Kapazität des SR enthäuteter Skelettmuskelfasern von 15 - 33 mM, was gut mit den an SR-Vesikeln ermittelten Ergebnissen übereinstimmt.

Neuere Untersuchungen an den in 2 Fraktionen, "leichte" und "schwere", auftrennbaren SR-Vesikeln (MEISSNER, 1975; LAU, CASWELL & BRUNSCHWIG, 1977) haben jedoch ein differenzierteres Bild von der Ca-Verteilung und dem Ca-Gehalt des SR entwickelt. Die schweren Vesikel, die wahrscheinlich von den terminalen Zisternen des SR stammen, besitzen nach der Isolation aus dem Muskelgewebe eine endogene Ca-Gesamtkonzentration von ca. 50 mM (CAMPBELL, FRANZINI-ARMSTRONG & SHAMOO, 1980). Dagegen beträgt der endogene Ca-Gehalt der wahrscheinlich aus dem longitudinalen SR isolierten leichten Vesikel nur etwa 1/10 dieser Konzentration (CAMPBELL et al., 1980). Das Volumen dieser Vesikeltypen liegt bei etwa 3,6 µl SR/mg SR-Protein für die leichte, und 2,1 µl SR/mg SR-Protein für die schwere Fraktion (CAMPBELL et al., 1980). Diese mit modernen Methoden bestimmten Volumina sind deutlich kleiner als die in früheren Untersuchungen gefundenen Werte (s.o.), so daß die maximale Ca-Kapazität des SR um einen Faktor 3-5 größer sein könnte, als bisher angenommen wurde. Die aktive $Ca^{2+}$-Aufnahme durch die SR-Vesikel in Gegen-

wart von ATP führt zu ähnlich hohen, mit dem endogenen Ca-Gehalt vergleichbaren Ca-Gesamtkonzentrationen im SR (CAMPBELL & SHAMOO, 1980). Beide Vesikelfraktionen akkumulieren $Ca^{2+}$ mit einem biphasischen Zeitverlauf. Dabei wird während der initialen Phase von jeder der beiden Vesikelfraktionen innerhalb von weniger als 1 min bereits etwa 30 mM $Ca^{2+}$ aufgenommen (CAMPBELL & SHAMOO, 1980).

Die Matrix des SR der Skelettmuskelfaser enthält zwei $Ca^{2+}$-bindende Proteine, Calsequestrin und ein Protein mit einer hohen Affinität für $Ca^{2+}$. Man muß deshalb annehmen, daß nur ein Teil des im SR gespeicherten $Ca^{2+}$ in ionaler Form vorliegt. Calsequestrin (Mac LENNAN & WONG, 1971), ein Glycoprotein mit einer hohen $Ca^{2+}$-Bindungskapazität ($\approx$45 mol $Ca^{2+}$/mol Protein) und einer geringen Affinität für $Ca^{2+}$ (Mac LENNAN & HOLLAND, 1975; TADA, YAMAMOTO & TONOMURA, 1978), ist praktisch ausschließlich in den terminalen Zisternen des SR lokalisiert (JORGENSEN, KALNINS & Mac LENNAN, 1979). Dieses Protein repräsentiert wahrscheinlich den hauptsächlichen $Ca^{2+}$-Speicher innerhalb der terminalen Zisternen des SR (Mac LENNAN & HOLLAND, 1975; TADA et al., 1978). Das zweite im SR-Lumen lokalisierte $Ca^{2+}$-bindende Protein besitzt eine $Ca^{2+}$-Bindungsstelle mit einer hohen Bindungskonstanten für $Ca^{2+}$ von $2\text{-}3\cdot10^{5}$ $M^{-1}$ und etwa 25 Bindungsstellen mit geringer $Ca^{2+}$-Affinität. Die Funktion dieses Proteins, das wahrscheinlich nur im longitudinalen SR vorliegt (LAU et al., 1977; CAMPBELL et al., 1980), ist unbekannt (Mac LENNAN & HOLLAND, 1975; TADA et al., 1978).

Die SR-Membran enthält nur wenige Proteine. Allein 90 % der intrinsischen Membranproteine entfallen auf die $Ca^{2+}$- und $Mg^{2+}$-abhängige ATPase, die den aktiven $Ca^{2+}$-Transport ins SR ausführt (Mac LENNAN & HOLLAND, 1975). Diese $Mg^{2+}$-abhängige $Ca^{2+}$-Pumpe, mit einem Molekulargewicht von 100 000, ist mit Ausnahme der Füßchen-Region der terminalen Zisterne über die gesamte SR-Membran verteilt (JORGENSEN et al., 1979; FRANZINI-ARMSTRONG, 1980). Das isolierte Enzym enthält eine Phospholipid-Komponente und geringe Mengen eines Proteolipids, die beide die ATPase-

Aktivität und den $Ca^{2+}$-Transport modulieren können (Mac LENNAN & HOLLAND, 1975; TADA et al., 1978). In der SR-Membran ist außerdem eine $Ca^{2+}$-abhängige Proteinkinase und eine Proteinphosphatase nachgewiesen worden, die an der Regulation der $Ca^{2+}$-Transport-ATPase beteiligt sein könnten (HÖRL & HEILMEYER, 1978; HÖRL, JENNISSEN & HEILMEYER, 1978).

Der Mechanismus des $Ca^{2+}$-Transports ins SR ist detailliert an SR-Vesikeln und an der isolierten SR-ATPase untersucht worden. Er kann zusammenfassend folgendermaßen beschrieben werden (umfassende Darstellung z.B. bei Mac LENNAN & HOLLAND, 1975; TADA et al., 1978; de MEIS & VIANNA, 1979). Die SR-ATPase wird an der cytoplasmatischen Oberfläche der SR-Membran unter Hydrolyse von MgATP in einem $Ca^{2+}$-abhängigen Schritt phosphoryliert. Das phosphorylierte Enzym transportiert 2 $Ca^{2+}$ pro hydrolysiertem ATP-Molekül durch die SR-Membran und setzt sie an der Innenseite der Membran frei. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Transportvorgangs stellt die Dephosphorylierung des Enzyms dar, für die $Mg^{2+}$ an der Innenseite der SR-Membran benötigt wird. Die Reaktionsprodukte $Mg^{2+}$, ADP und $P_i$ werden an der cytoplasmatischen Oberfläche des SR freigesetzt.

Der $Ca^{2+}$-Transport ins SR kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflußt werden. Für eine Regulation des Ca-turnover der Muskelzelle während der Aktivierung sind die nachfolgend aufgeführten Modifikationen des $Ca^{2+}$-Transports vermutlich von besonderer Bedeutung.

Eine Erhöhung der $Mg^{2+}$-Konzentration verursacht eine Beschleunigung der Dephosphorylierung der SR-ATPase (KANAZAWA, YAMADA, YAMAMOTO & TONOMURA, 1971) und damit des $Ca^{2+}$-Transports. Während des aktiven $Ca^{2+}$-Transports wird eine dem aufgenommenen $Ca^{2+}$ äquivalente Menge an $Mg^{2+}$ und $K^{+}$ aus dem SR freigesetzt (CARVALHO, 1966; CARVALHO & LEO, 1967). Diese Ionen werden möglicherweise als Gegenionen für $Ca^{2+}$ aus dem SR transportiert (KANAZAWA et al., 1971; TADA et al., 1978). Anscheinend wird der $Ca^{2+}$-Transport nicht völlig durch einen Gegentransport dieser Kationen kompensiert, denn in Medien, die ein schlecht

permeables Anion enthalten, wird durch den aktiven $Ca^{2+}$-Transport ein großes, innen positives Membranpotential (60-100 mV) an SR-Vesikeln aufgebaut (DUPONT, 1979; BEELER, 1980). Dieses durch die elektrogene $Ca^{2+}$-Pumpe erzeugte Membranpotential ist jedoch wegen der hohen Permeabilität der SR-Membran für physiologische Ionen (MEISSNER & Mc KINLEY, 1976; SOMLYO et al., 1977) wahrscheinlich nicht langlebig genug, um zu einem Ruhepotential des SR in vivo beizutragen (BEELER, 1980). Ein vorher den SR-Vesikeln aufgeprägtes Membranpotential beeinflußt umgekehrt auch die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR. So bewirkt ein im SR-Lumen negatives Membranpotential sowohl eine Erhöhung der $Ca^{2+}$-Transportrate (DUPONT, 1979; BEELER, 1980) als auch der Ca-Kapazität des SR (BEELER, 1980). Über diesen Mechanismus könnte z.B. eine Änderung des SR-Membranpotentials während der $Ca^{2+}$-Freisetzung (s. Kap. 1.1) die Rate der $Ca^{2+}$-Reakkumulation ins SR regulieren.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Ca-turnover während der Aktivierung der Muskelfaser wird durch die Abhängigkeit der $Ca^{2+}$-Aufnahme von der intra- und extraluminalen $Ca^{2+}$-Konzentration des SR angedeutet. Ein Anstieg der $Ca^{2+}$-Konzentration im SR-Lumen führt zu einer kompetitiven Hemmung der $Mg^{2+}$-abhängigen Dephosphorylierung der SR-ATPase (YAMADA & TONOMURA, 1972). Dieser Effekt könnte für die beobachtete Hemmung der $Ca^{2+}$-Transportrate durch das ins SR aufgenommene $Ca^{2+}$ (WEBER, 1971a; b) verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu führt ein Anstieg der sarcoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration im Bereich von $10^{-8}$ - $10^{-6}$ M zu einer Erhöhung der SR-ATPase-Aktivität (HASSELBACH & MAKINOSE, 1963; WEBER et al., 1966; YAMAMOTO & TONOMURA, 1967) und der $Ca^{2+}$-Akkumulationskapazität des SR (OGAWA, 1970). Auf diese Weise könnte das während der Muskelaktivierung ins Sarcoplasma freigesetzte $Ca^{2+}$ selbst seine Reakkumulation ins SR regulieren.

Der $Ca^{2+}$-Transport am SR des Herzmuskels wird durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung (WRAY, GRAY & OLSSON, 1973; TADA, KIRCHBERGER, REPKE & KATZ, 1974) und Dephosphorylierung

(KIRCHBERGER & RAFFO, 1977) eines intrinsischen Membranproteins (Phospholamban) kontrolliert. An SR-Vesikeln des schnellen Skelettmuskels wurde dagegen keine Phosphorylierung eines solchen Regulatorproteins durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase gefunden (KIRCHBERGER & TADA, 1976; SCHWARTZ, ENTMAN, KANIIKE, LANE, Van WINKLE & BORNET, 1976). Im Widerspruch zu KIRCHBERGER & TADA (1976), die auch keine Beeinflussung des $Ca^{2+}$-Transports ins SR durch die cAMP-abhängige Proteinkinase beobachteten, fanden SCHWARTZ et al. (1976) eine Stimulation der $Ca^{2+}$-Aufnahme durch dieses Enzym, ohne daß gleichzeitig eine Phosphorylierung eines SR-Membranproteins erfolgte. Aufgrund dieser Diskrepanzen bleibt die regulatorische Funktion des cAMP-Proteinkinase-Systems und des Phospholambans beim $Ca^{2+}$-Transport des Skelettmuskel-SR noch weitgehend unklar (vgl. auch SCHWARTZ et al., 1976).

Ebenso wie die myofibrilläre ATPase (s.o.) ist auch die SR-ATPase durch Sr-Ionen aktivierbar (WEBER et al., 1966; Yamada & TONOMURA, 1972; MERMIER & HASSELBACH, 1976). Die Affinität dieses Enzyms für $Sr^{2+}$ ist jedoch etwa 80-mal kleiner als für $Ca^{2+}$ (TADA et al., 1978). Auch im ATP-abhängigen Transportvorgang selbst kann $Ca^{2+}$ durch $Sr^{2+}$ ersetzt werden (WEBER et al., 1966). In einer vergleichenden Untersuchung der aktiven $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Akkumulation an SR-Vesikeln in Abwesenheit präzipitierender Substanzen zeigten MERMIER & HASSELBACH (1976), daß $Sr^{2+}$ mit einem monophasischen Zeitverlauf und einer Transportrate von 1 (mol $Sr^{2+}$/mol ATP) aufgenommen wird. Die Aufnahme von $Ca^{2+}$ ins SR erfolgte dagegen mit einem biphasischen Zeitverlauf, wobei sich die Transportrate mit zunehmender Zeit von 2 auf 1 verringerte. Ein überraschendes Ergebnis dieser Studie ist die im Vergleich zu $Ca^{2+}$ sehr hohe Speicherkapazität des SR für $Sr^{2+}$ ($\approx$300 mM), die 10-20-mal größer war als die während der schnellen Phase vom SR aufgenommene maximale Ca-Konzentration.

## 1.6 Ausblick auf die vorliegende Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen des kontraktilen Systems und der $Ca^{2+}$-Aufnahme und $Ca^{2+}$-Freisetzung des SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser vorgestellt, die eine Fortsetzung der experimentellen Arbeit von MOISESCU & THIELECZEK (1978a; 1979) an diesem Präparat darstellen.

Die in den Experimenten verwendeten Badlösungen wurden nach den von MOISESCU & THIELECZEK (1978a) eingehend diskutierten Prinzipien zusammengestellt. Derartige Lösungen ermöglichen eine weitestgehende Kontrolle des ionalen Milieus in der Umgebung der funktionellen Systeme innerhalb der enthäuteten Faser während eines Aktivierungsschrittes und erfüllen damit eine Voraussetzung zur quantitativen Untersuchung dieses komplexem Präparates (s. Kap. 2.3). Zur Herstellung definierter Badlösungen mit physiologischer Ionenzusammensetzung ist die Kenntnis der apparenten Affinitätskonstanten der Liganden der Lösungen für die vorliegenden Ionen nötig. Diese Konstanten wurden mit Hilfe einer eigenen Methode (THIELECZEK, 1977; MOISESCU & THIELECZEK, 1979 ) ermittelt. Zur experimentellen Bestimmung des bei der quantitativen Untersuchung der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion benötigten apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP wurde eine neue Methode entwickelt.

Die vorliegende Arbeit liefert Beiträge zum näheren Verständnis einiger in der Einleitung dargestellter Probleme und beantwortet einige der dort formulierten Fragen. Im einzelnen lassen sich die Versuche nach den untersuchten Phänomenen folgendermaßen zusammenfassen:

Direkte Aktivierung des Kontraktionsmechanismus

(a) Experimente zur Aktivierung des kontraktilen Systems der Skelettmuskelfaser mit $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$ und $Ni^{2+}$.
(b) Quantitative Untersuchung der steady-state-Aktivierung und Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung.

(c) Entwicklung eines Reaktionsmodells der kontraktilen Einheit zur Erklärung der $Ba^{2+}$-induzierten Veränderung der Ca-Aktivierungskurve.
(d) Charakterisierung des kontraktilen Mechanismus an Hand der Daten der steady-state-Aktivierungskurven für die verschiedenen divalenten Kationen.

$Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem Sarcoplasmatischen Reticulum

(a) Charakterisierung einiger Eigenschaften der $Ca^{2+}$-induzierten und Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR unter weitgehend physiologischen Bedingungen.
(b) Nähere Untersuchung der Coffein-Wirkung auf das SR der enthäuteten Faser.
    (1) Einfluß einer Substanz ($SCN^-$), die die elektro-mechanische Kopplung beeinflußt;
    (2) Bedeutung einer bestimmter funktionellen Gruppe des Xanthin-Moleküls für eine "Coffein-artige" Wirkung.

$Ca^{2+}$-Aufnahme ins Sarcoplasmatische Reticulum

(a) Entwicklung eines Modells zur quantitativen Analyse des Zeitverlaufs von Coffein-induzierten Spannungstransienten.
(b) Bestimmung der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Speicherkapazität des SR der enthäuteten Faser mit Hilfe des Modells unter (a).
(c) Untersuchung des Einflusses des pH auf die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR.

In den Experimenten am SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser wurde die Spannungsentwicklung des kontraktilen Systems infolge einer Stimulation des SR des Präparates als Indikator für eine $Ca^{2+}$-Freisetzung bzw. eine vorausgegangene $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR benutzt. Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht (MILLER & THIELECZEK, 1977).

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Präparation der enthäuteten Skelettmuskelfaser

Die Präparation enthäuteter Skelettmuskelfasern (Myofibrillenbündel) erfolgte im wesentlichen nach einer von THIELECZEK (1977) ausführlich beschriebenen Methode. Zunächst wurde eine Einzelfaser des Musculus iliofibularis des Frosches (Rana esculenta) freigelegt. Von dieser Muskelfaser wurde dann mit Hilfe scharfer Nadeln und feiner Pinzetten nach einer Methode von NATORI (1954) das Sarcolemma entfernt. Diese "Enthäutung" erfolgte entweder unter pharmazeutisch reinem Paraffinöl (Merck) oder in einem Tröpfchen Erschlaffungslösung (Tab. 1, Lösg. B ) unter Öl. An ein Ende der enthäuteten Faser wurde ein sehr feiner Faden chirurgischer Seide geknotet, mit dessen Hilfe das Präparat in der Versuchsapparatur befestigt wurde (s.u.).

Für Experimente am SR der enthäuteten Muskelfaser wurden dickere Präparate mit Durchmessern von 60-100 µm verwendet. Diese enthäuteten Fasern, bei denen nur die Zellmembran zusammen mit einer peripheren Sarcoplasma-Schicht entfernt wurde, sollten zumindest in zentralen Regionen eine intakte Struktur besitzen. Für Experimente am kontraktilen System der Muskelfaser, wo ein funktionsfähiges SR nicht wesentlich ist, wurde die enthäutete Muskelfaser mehrmals aufgespalten. Diese Präparation ergab ein dünnes Myofibrillenbündel (Ø 30-60 µm), das für eine rasche homogene Aktivierung des kontraktilen Apparates besonders geeignet ist (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1978a).

## 2.2 Versuchsanordnung und -ablauf

### 2.2.1 Versuchsapparatur

Die Versuchsanordnung zur Messung isometrischer Spannungsänderungen enthäuteter Muskelfasern (Abb. 1) entsprach weitgehend der von MOISESCU & THIELECZEK (1978a). Ein Ende des Präparates wurde mit einem Faden (s.o.) an dem Arm eines mechano-elektrischen Transducers (RCA 5734) befestigt, das andere Ende wurde

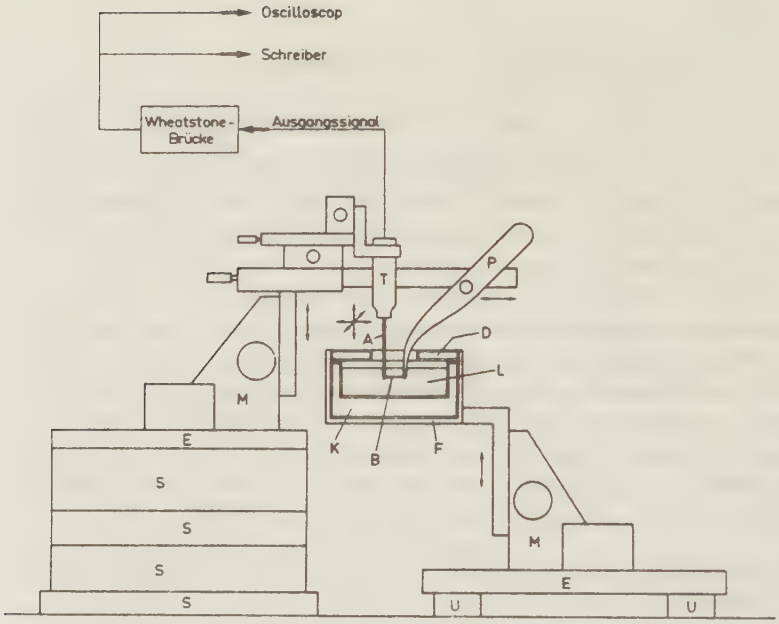



Abb. 1

Schema der Versuchsapparatur

| | | | |
|---|---|---|---|
| B | Myofibrillenbündel | D | Deckel |
| T | Mechanoelektrischer Transducer | F | Führung |
| A | Transducerarm | M | Mikromanipulator |
| P | Pinzette | E | Stahlplatte |
| L | Zelle mit Badlösung | U | Puffer |
| K | Kammer | S | Schaumstoff |

Die Doppelpfeile deuten die Bewegungsmöglichkeiten einzelner Teile der Apparatur an. Die Kammer konnte senkrecht zur Bildebene in der Führung hin und her bewegt werden.

in eine feine augenchirurgische Pinzette (Geuder) geklemmt. Mit Hilfe verschiedener Mikromanipulator-Feintriebe ließ sich das Myofibrillenbündel, dessen durchschnittliche Länge 2,0 $\pm$ 0,4 mm betrug, horizontal in die von dem Transducerarm und der Pinzettenspitze gebildete Ebene einjustieren.

Das Ausgangssignal des Transducer-Brücken-Kreises wurde mit einem Speicheroscilloscop (Tektronix) aufgezeichnet und für die Auswertung mit einer Motorkamera (Grass C4P) fotografiert. Häufig wurde parallel ein Direktschreiber für die Registrierung benutzt. Das Meßsystem besaß eine Eigenfrequenz von 166 $s^{-1}$ und eine Empfindlichkeit von 200 mV/mN bei einer Nachgiebigkeit von $< 2$ µm/mN.

Die Versuchskammer aus Perspex besaß 18 hintereinanderliegende Zellen (Vol. 3,6 ml) für die Aufnahme der Badlösungen. Sie war in Längsrichtung in einer mit einem Deckel versehenen Führung verschiebbar. Die Zellen wurden, mit Ausnahme einer Position unter einer Öffnung, in allen Stellungen von dem Deckel bedeckt. Diese Konstruktion trug zur Verminderung der Verdunstung und zur Konstanthaltung der Temperatur der Badlösungen (s.u.) bei. Durch die Deckelöffnung ragte der Transducerarm und die Pinzettenspitze mit der eingesetzten enthäuteten Faser in die darunterliegende Badlösung. Ein Lösungswechsel wurde durchgeführt, indem eine andere Badlösung in diese Position gebracht wurde. Deckel und Versuchskammer konnten mit Kühlflüssigkeit durchströmt werden (Kühleinheit Haake K11, Thermostatpumpe Haake E12). Auf diese Weise ließ sich die Temperatur der Badlösungen und der Luftschicht über ihnen innerhalb $\pm$ 1 °C konstant halten.

### 2.2.2 Vermessung des Präparates und Lösungswechsel

Zur Messung des Durchmessers und der Sarcomerlänge wurde das in die Apparatur eingesetzte Präparat in eine Glasküvette mit einer Standard-Erschlaffungslösung (Tab. 1, Lösg. B ) überführt. War die enthäutete Muskelfaser für Untersuchungen am SR bestimmt, so wurde sie vor dieser Vermessung nacheinander in 3

separate Lösungen vom Typ B gebracht, um das von der Präparation anhaftende Paraffinöl auszuwaschen. War das Myofibrillenbündel zur Untersuchung des kontraktilen Systems vorgesehen, so wurde diesen Schritten noch eine Inkubation (30 sec) in einer identischen Erschlaffungslösung mit 0,1 Volumen-% der nichtionalen Detergenz Triton X-100 (Merck) vorangestellt. Durch diese Wasch-Schritte wird das Paraffinöl praktisch völlig vom Präparat entfernt, so daß seine gesamte Oberfläche beim Eintauchen in eine der Badlösungen der Versuchskammer (s.u.) gleichzeitig und vollständig benetzt wird (vgl. HELLAM & PODOLSKY, 1969).

Die Vermessung des Präparates erfolgte unter Benutzung eines Objektivs mit langer Brennweite (Leitz UMK 50/0.6). Vorher wurde das Myofibrillenbündel in der Erschlaffungslösung so weit gedehnt, daß eine gerade meßbare Änderung der Ruhespannung auftrat. Die auf diese Weise standardisierten Präparate besaßen durchschnittliche Sarcomerlängen von 2,2-2,4 µm (vgl. auch ENDO, 1972).

Der Wechsel der Badlösungen erfolgte nach einer ähnlichen Methode wie bei HELLAM & PODOLSKY (1969). Er ließ sich in etwa 2-3 sec durchführen. Dazu wurde die gesamte Versuchskammer so weit gesenkt, daß das Präparat gerade aus der unter der Deckelöffnung befindlichen Badlösung (s.o.) auftauchte. Dann wurde die gewünschte Badlösung unter das Myofibrillenbündel gebracht und die Versuchskammer wieder in ihre Ausgangslage gehoben. Die enthäutete Faser, deren Position bei dieser Prozedur nicht verändert wurde, befand sich dann ca. 3 mm unterhalb der Oberfläche der neuen Badlösung. Beim Durchtritt durch die Lösungsoberfläche wird das Myofibrillenbündel nicht beschädigt (FORD & PODOLSKY, 1972a; ASHLEY & MOISESCU, 1977). Eigene Versuche, in denen der Lösungswechsel ohne einen Transfer des Präparats durch die Luft-Lösung-Grenzfläche erfolgte, haben ergeben, daß das Präparat durch die mechanische Beanspruchung beim Durchtritt durch die Grenzfläche auch funktionell nicht beeinträchtigt wird (MOISESCU & THIELECZEK, unveröffentlicht).

## 2.3 Lösungen

Die Aktivierung des kontraktilen Apparates oder des SR der enthäuteten Muskelfaser bringt einige komplexe Diffusionsprobleme mit sich, weil die für eine physiologische Aktivierung benötigten Ionen von außerhalb (aus der Badlösung) an die funktionellen Systeme des Präparates gelangen müssen. Dieser Diffusionsvorgang ist besonders bei kinetischen Untersuchungen der Spannungsentwicklung des kontraktilen Systems zu beachten. Hier muß eine hinreichend schnelle Erhöhung der gepufferten Konzentration eines Aktivators (z.B. $Ca^{2+}$ oder $Sr^{2+}$) im gesamten Präparat erreicht werden, damit dieser Diffusionsprozeß nicht zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. MOISESCU (1976) und MOISESCU & THIELECZEK (1978a) zeigten, daß dieses Problem gelöst werden kann, wenn man (1) möglichst dünne Präparate benutzt, (2) Aktivierungslösungen mit einer hohen Pufferkapazität (hohe EGTA-Konzentration) für das aktivierende Ion ($Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$ u.a.) verwendet und (3) das Präparat vor der Überführung in die Aktivierungslösung in einer Lösung mit einer geringen Pufferkapazität (geringe EGTA-Konzentration) für das aktivierende Ion äquilibriert. Dabei ist es jedoch wichtig, das in der dem Aktivierungsschritt vorangestellten Lösung fehlende EGTA durch eine Substanz mit einer geringen Affinität für das aktivierende Ion zu ersetzen. Anderenfalls würden sich beim Lösungswechsel vorübergehende Änderungen der Ionenzusammensetzung, der Ionenstärke und der Tonizität innerhalb des Präparates ergeben, die die Spannungsentwicklung stark beeinflussen könnten. Ein in dieser Hinsicht nahezu idealer Substituent für EGTA ist HDTA (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Die übrige Zusammensetzung aller Badlösungen für ein Experiment sollte aus den oben erwähnten Gründen konstant gehalten werden.

Der Zeitverlauf der Spannungsentwicklung und die steady-state-Kontraktion kann aber auch durch die inhärente ATPase-Aktivität der enthäuteten Muskelfaser wesentlich beeinflußt werden. Diese ATPase-Aktivität verursacht bei unzureichender Nachdiffusion von MgATP aus dem Bad eine Abnahme der MgATP-Konzentration

innerhalb des Präparates und verändert dadurch auch die freie Mg-Konzentration. Beide Vorgänge hätten eine starke Beeinflussung der Spannungsentwicklung zur Folge (s. Kap. 1.4 ). Diese Schwierigkeiten lassen sich jedoch erheblich vermindern, wenn den Badlösungen ein ATP-regenerierendes System, bestehend aus Creatinphosphat (CP) und Creatinkinase (CK), zugegeben wird (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Dadurch kann die MgATP-Konzentration im Präparat innerhalb gewisser Grenzen gehalten werden, so daß der Prozeß der Spannungsentwicklung nicht durch die ATP ase-Aktivität in diesem Sinne beeinflußt wird (GODT, 1974).

Weitere Probleme resultieren aus der Tatsache, daß bei der ATP-Hydrolyse Protonen und anorganisches Phosphat als Reaktionsprodukte freigesetzt werden. Eine lokale Änderung der Protonen-Konzentration hätte eine Änderung der apparenten Affinitätskonstanten für $Ca^{2+}$ eines pH-sensitiven $Ca^{2+}$-Puffers, wie z.B. EGTA (PORTZEHL et al., 1964), und damit der freien Ca-Konzentration im Präparat zur Folge. Um diesen Effekt, der selbstverständlich die Kraftentwicklung wesentlich beeinflussen würde, weitgehend auszuschließen, wurden von MOISESCU & THIELECZEK (1978a) Badlösungen mit sehr hohen Konzentrationen eines pH-Puffers (TES; pK=7.5 bei 20 °C) mit einer vernachlässigbaren Affinität für divalente Kationen (GOOD, WINGET, WINTER, CONNOLLY, IZAWA & SINGH, 1966) benutzt. Die Ausbildung eines $Ca^{2+}$- und/oder $Mg^{2+}$-Konzentrationsgradienten innerhalb der enthäuteten Faser infolge des Auftretens eines Konzentrationsgradienten für anorganisches Phosphat (s.o.) kann durch die Verwendung von Badlösungen mit einer hohen Pufferkapazität für $Ca^{2+}$ (hohe EGTA-Konzentration) und $Mg^{2+}$ (ATP plus ATP-regenerierendes System) minimalisiert werden (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Badlösungen wurden entsprechend den oben erläuterten Prinzipien zusammengestellt. In den $Ba^{2+}$- und $Cd^{2+}$-Aktivierungsexperimenten am kontraktilen Apparat der enthäuteten Muskelfaser (s. Kap. 3.1 ) war es mit diesen Lösungen möglich, die freie Ba- bzw. Cd-Konzentration im

gesamten Präparat schnell auf den gewünschten Wert einzustellen und dadurch eine schnelle und gleichmäßige Aktivierung auszulösen. Darüber hinaus konnten in den Experimenten am SR (s. Kap. 3.2) mit Hilfe derartiger Lösungen an ein und derselben enthäuteten Faser viele transiente Kontraktionen durch wiederholte $Ca^{2+}$ (bzw. $Sr^{2+}$)-Freisetzungen aus dem SR induziert werden, ohne das Gleichgewicht der anderen Ionenarten zu stören und die Eigenschaften des SR und des kontraktilen Systems oder die Homogenität des Präparates wesentlich zu verändern.

Die aktuellen Badlösungen wurden unter Verwendung der in Tab. 1 aufgelisteten Lösungen hergestellt (s. Kap.2.3.1). Deren Zusammensetzung wird durch die geplanten Konzentrationen der verschiedenen Kationen und durch die apparenten Affinitätskonstanten der Liganden der Badlösung (ATP, EGTA, HDTA, CP) für die relevanten Kationen ($H^+$, $K^+$, $Na^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$) bestimmt. Die apparenten Bindungskonstanten wurden nach einer Methode von MOISESCU & THIELECZEK (1979; ausführliche Darstellung bei THIELECZEK, 1977) für die jeweils in einer Lösung vorliegende Kationen-Zusammensetzung ermittelt (s. Kap.2.3.2).

Bei der Herstellung von $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen mit hohen freien Ba-Konzentrationen zur maximalen Aktivierung des kontraktilen Systems wurde das apparente Löslichkeitsprodukt des schwerlöslichen Salzes BaATP überschritten (s. Kap.2.3.1). Um diese Lösungen trotz der resultierenden Präzipitation von BaATP verwenden zu können, wurde das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP experimentell bestimmt (s. Kap.2.3.3).

In den Experimenten zur Aktivierung des kontraktilen Apparates mit dem Schwermetallion $Cd^{2+}$ (Kap.3.1.5) konnte EGTA wegen seiner sehr hohen apparenten Bindungskonstanten für $Cd^{2+}$ (Tab. 2, Kap. 2.3.3) nicht als $Cd^{2+}$-Puffer verwendet werden. Auch HDTA, das formal die Funktion eines $Cd^{2+}$-Puffers übernehmen könnte (Tab. 2), war aufgrund einer Präzipitatbildung in den Lösungen nicht geeignet, so daß Succinat und ATP (Tab. 2) zur Pufferung der freien Cd-Konzentration benutzt wurden (s. Kap. 3.1.5). Da in

diesen Lösungen der $Ca^{2+}$-Chelator EGTA fehlte, durfte die $Ca^{2+}$-Kontamination der Substanzen (Reinheitsgrad generell "pro analysi" bzw. vergleichbare Reinheit) nicht vernachlässigt werden. Um eine solche "endogene" $Ca^{2+}$-Kontamination zu reduzieren, wurden die zur Herstellung der Badlösungen verwendeten Stammlösungen durch eine Säule mit einem Chelator-Ionenaustauscher (Dowex A1, Sigma) mit einer hohen $Ca^{2+}$-Affinität geschickt (s. Kap. 2.3.4). Die Ca-Gesamtkonzentration derartiger EGTA-freier Badlösungen wurde im Anschluß an die $Cd^{2+}$-Aktivierungsexperimente mit Hilfe eines Atomabsorptions-Spektrophotometers gemessen (s. Kap. 2.3.4).

### 2.3.1 Herstellung der Badlösungen

Als Standard-Bedingungen für die Experimente an enthäuteten Muskelfasern wurden folgende Ionenkonzentrationen gewählt (mM): $Mg^{2+}$ 1, $K^+$ 137, $Na^+$ 36, pH 7,10. Diese Ionenzusammensetzung kommt der intrazellulären ionalen Situation in Vertebraten-Skelettmuskelfasern sehr nahe (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Badlösungen mit einer derartigen Grundzusammensetzung wurden aus den in der Tab. 1 aufgeführten Stammlösungen nach einer von ASHLEY & MOISESCU (1977) und MOISESCU & THIELECZEK (1978a) beschriebenen Methode hergestellt.

Durch Mischen einer Lösung vom Typ A (AC, AS, AB; Tab. 1 ) mit einer Lösung vom Typ B (Tab. 1 ) läßt sich jeweils ein Satz von Badlösungen mit verschiedenen gepufferten Konzentrationen des aktivierenden Kations ($Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$ bzw. $Ba^{2+}$) bei im übrigen identischer Ionenzusammensetzung herstellen. Beide Lösungen A und B enthalten dieselben Konzentrationen ($C_i$) an: EGTA ($C_1$), CP ($C_2$), ATP ($C_3$), TES, CK, $H^+$, $K^+$, $Na^+$ und $Cl^-$. Die Lösung vom Typ A enthält zusätzlich das aktivierende Kation $y_j$ ($y_1=Ca^{2+}$, $y_2=Sr^{2+}$, $y_3=Ba^{2+}$) in der Konzentration $C_{yj}=z \cdot C_1$ $(0 < z \leq 1)$. Die zur Einstellung der gewünschten freien Mg-Konzentration, $[Mg^{2+}]$, der Badlösungen benötigte Mg-Gesamtkonzentration der Lösungen vom Typ A und B ($Mg_A$ bzw. $Mg_B$) ist gegeben durch (ASHLEY & MOISESCU, 1977):

$$(1) \qquad Mg_B = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{3} C_i \cdot \beta_i \cdot (1+\beta_i)^{-1}$$

$$(2) \qquad Mg_A = Mg_B - z \cdot C_1 \cdot \beta_1 \, (1+\beta_1)^{-1}$$

Darin ist $\beta_i = Kapp_{Mg}^{Xi} \cdot [Mg^{2+}]$, (i = 1, ..., 3) und $Kapp_{Mg}^{Xi}$ repräsentiert die apparente Bindungskonstante des Liganden $X_i$ ($X_1$ = EGTA, $X_2$ = CP, $X_3$ = ATP; s. Tab. 2, Kap.2.3.2)für $Mg^{2+}$. Werden zwei derartig zusammengesetzte Lösungen vom Typ A und B miteinander gemischt, so ist der relative Fehler zwischen der aktuellen $Mg^{2+}$-Konzentration der Badlösung und der gewünschten $Mg^{2+}$-Konzentration kleiner als 6 % (berechnet nach ASHLEY & MOISESCU, 1977). Enthält die Mischung einen Volumenanteil a der Lösung A, so kann die aktuelle freie Konzentration ($C_{yj}^{2+}$) des aktivierenden Kations $y_j$ dieser Badlösung aus der folgenden Gleichung berechnet werden (ASHLEY & MOISESCU, 1977):

$$(3) \qquad a \cdot z \cdot C_1 = C_{yj}^{2+} + \sum_{i=1}^{3} C_i \cdot \alpha_{ij} \cdot (1 + \alpha_{ij} + \beta_i)^{-1}$$

Darin ist $\alpha_{ij} = Kapp_{yj}^{Xi} \cdot C_{yj}^{2+}$ und $Kapp_{yj}^{Xi}$ stellt die apparente Affinitätskonstante des Liganden $X_i$ für das divalente Kation $y_j$ dar (s. Tab. 2 , Kap. 2.3.2).

Die nach dieser Methode hergestellten $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AC/B und $Sr^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AS/B (s. Tab. 1 ) decken den für die jeweilige Aktivierung des kontraktilen Apparates wichtigen $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Konzentrationsbereich ab (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1979).

Mit gleichartigen $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AB/B kann dagegen nur eine freie Ba-Konzentration bis zu 0.7 mM kontrolliert eingestellt werden, die für eine maximale Kraftentwicklung nicht ausreicht (s. Kap.3.1.1). Zur Einstellung höherer freier Ba-Konzentrationen wurden 2 Typen von Lösungen ohne Mg verwendet, die entweder $BaEGTA^{2-}$ (Lösg.CE, Tab. 1 ) oder $H_2HDTA^{2-}$ (Lösg. CH, Tab. 1 ) als hauptsächliches Anion enthielten. Mit

Tabelle 1. Zusammensetzung der Stammlösungen, die zur Herstellung der aktuellen Badlösungen benutzt wurden

| Lösung | $K^+$ (mM) | $Mg_{total}$ (mM) | CK (U/ml) | HDTA (mM) | EGTA (mM) | CaEGTA (mM) | SrEGTA (mM) | BaEGTA (mM) | $K_2$Succinat (mM) | $Mg^{2+}$ (mM) | pH | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB | 137 | 8,05 | 15 | – | 5 | – | – | 45 | – | 1 | 7,10 | 23 |
| AC | 137 | 8,05 | 15 | – | – | 50 | – | – | – | 1 | 7,10 | 10; 23 |
| AM | 137 | 8,05 | 15 | – | – | – | – | 50 | – | 1 | 7,10 | 10 |
| AS | 137 | 8,5 | 15 | – | 10 | – | 40 | – | – | 1 | 7,10 | 10; 23 |
| B | 137 | 10,25 | 15 | – | 50 | – | – | – | – | 1 | 7,10 | 23 |
| B' | 137 | 9,7 | 15 | – | 50 | – | – | – | – | 1 | 7,10 | 10 |
| CE | 137 | – | 15 | – | – | – | – | 50 | – | – | 7,10 | 23 |
| CH | 137 | – | 15 | 50 | – | – | – | – | – | – | 7,10 | 23 |
| H | 137 | 8,45 | 15 | 50 | – | – | – | – | – | 1 | 7,10 | 10; 23 |
| M | 137 | – | 15 | – | 40 | – | – | – | – | – | 6,6-7,6 | 10; 23 |
| MC | 137 | – | 15 | – | – | 40 | – | – | – | – | 6,6-7,6 | 10; 23 |
| N | 237 | – | 15 | 30 | 20 | – | – | – | – | – | 7,10 | 23 |
| S | 137 | – | – | – | – | – | – | – | 50 | – | 7,10 | 23 |

Alle Lösungen enthielten 8 mM ATP, 10 mM CP und 36 mM $Na^+$, und der pH der Lösungen wurde bei der gegebenen Temperatur auf den angegebenen Wert $\pm$ 0,01 pH eingestellt. Die Lösungen M und MC enthielten den pH-Puffer MOPS (50 mM), während alle anderen Lösungen den pH-Puffer TES (60 mM) enthielten (s. Text).

(Erklärung der Abkürzungen siehe Tab. 2)

Hilfe dieser Lösungen wurden individuelle $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen entweder durch Mischen der Lösung CE mit B und adäquate Addition von $MgCl_2$ oder durch ausschließliche Addition von $BaCl_2$ und $MgCl_2$ zur Lösung CE bzw. CH hergestellt. Sie unterscheiden sich dadurch, daß die freie Ba-Konzentration in der Lösung vom Typ CE/B gut durch EGTA und ATP gepuffert ist, während sie in den Badlösungen CE ($Ba_{ges} > EGTA_{ges}$) und CH (kein EGTA) nur schwach gepuffert ist. Die bei einer gegebenen freien Mg-Konzentration zur Einstellung der gewünschten freien Ba-Konzentration, $[Ba^{2+}]$, benötigte Ba-Gesamtkonzentration in Lösung CE bzw. CH ($Ba_{CE}$ bzw. $Ba_{CH}$) wurde analog zu Gl. (3) für jede individuelle $Ba^{2+}$-Aktivierungslösung folgendermaßen berechnet:

$$(4) \quad Ba_{CE} = [Ba^{2+}] + \sum_{i=1}^{3} C_i \cdot \alpha_{iBa} \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

$$(5) \quad Ba_{CH} = [Ba^{2+}] + \sum_{i=2}^{4} C_i \cdot \alpha_{iBa} \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

Der Index 4 in Gl. (5) kennzeichnet folgende Größen: $C_4$ ist die Konzentration des Liganden HDTA ($X_4$) der Lösung CH; $\alpha_{4Ba} = Kapp_{Ba}^{X_4} \cdot [Ba^{2+}]$ und $\beta_4 = Kapp_{Mg}^{X_4} \cdot [Mg^{2+}]$. Die zugehörigen apparenten Affinitätskonstanten sind der Tab. 2 zu entnehmen. Entsprechend folgt für die in die Lösung CE, Mischung CE/B oder Lösung CH zu addierende Mg-Gesamtkonzentration:

$$(6) \quad Mg_{CE} = Mg_{CE/B} = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{3} C_i \cdot \beta_i \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

$$(7) \quad Mg_{CH} = [Mg^{2+}] + \sum_{i=2}^{4} C_i \cdot \beta_i \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

In Badlösungen mit sehr hohen freien Ba-Konzentrationen trat eine BaATP-Präzipitatbildung auf (s. Kap.3.1.1). Um diese Lösungen, die für eine quantitative Untersuchung der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung sehr wichtig waren (s. Kap. 3.1.1), trotzdem nutzen zu können, wurde das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP, $Lapp_{Ba}^{ATP}$, experimentell bestimmt (s. Kap.2.3.3).

Mit Hilfe von $Lapp_{Ba}^{ATP}$ können die präzipitathaltigen Badlösungen quantitativ charakterisiert und kontrolliert eingestellt werden. Für ihre Herstellung wurden Lösungen vom Typ CE und CH verwendet. Die zur Einstellung bestimmter freier Ba- und Mg-Konzentrationen benötigten Gesamtkonzentrationen an Ba ($\overline{Ba}_{CE}$, $\overline{Ba}_{CH}$) und Mg ($\overline{Mg}_{CE}$, $\overline{Mg}_{CH}$) in diesen Lösungen sind durch die folgenden Gleichungen gegeben (Herleitung der Gleichungen in Kap. 5.2).

$$(8)\quad \overline{Ba}_{CE} = [Ba^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} C_i \cdot \alpha_{iBa} \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} - Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot (1 + \beta_3) \cdot [Ba^{2+}]^{-1} + C_3$$

$$(9)\quad \overline{Ba}_{CH} = \overline{Ba}_{CE} - C_1 \cdot \alpha_{1Ba} \cdot (1 + \alpha_{1Ba} + \beta_1)^{-1} + (1 + \alpha_{4Ba} + \beta_4)^{-1} \cdot C_4 \cdot \alpha_{4Ba}$$

$$(10)\quad \overline{Mg}_{CE} = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} C_i\beta_i \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} + [Ba^{2+}]^{-1} \cdot \beta_3 \cdot Lapp_{Ba}^{ATP}$$

$$(11)\quad \overline{Mg}_{CH} = \overline{Mg}_{CE} - C_1 \cdot \beta_1 \cdot (1 + \alpha_{1Ba} + \beta_1)^{-1} + (1 + \alpha_{4Ba} + \beta_4)^{-1} \cdot C_4 \cdot \beta_4$$

Aufgrund der Größe des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP wurde bei der gewählten Zusammensetzung der Badlösungen (s. Tab. 1) eine BaATP-Präzipitation für $[Ba^{2+}] > 3{,}71$ mM bei 1 mM $Mg^{2+}$ und für $[Ba^{2+}] > 10{,}16$ mM bei 3 mM $Mg^{2+}$ erwartet. Die beobachtete Präzipitatbildung sprach gut mit dieser Voraussage überein.

Die für die Einstellung hoher freier Ba-Konzentrationen erforderliche Addition von $BaCl_2$ zu den Lösungen vom Typ CE und CH hat

zur Folge, daß in diesen Badlösungen die $Cl^-$-Konzentration bis zu 40 mM und die Ionenstärke bis zu 35 mM höher ist als in den Standard-Aktivierungslösungen ($[Cl^-]$ = 20 mM; Ionenstärke 250 mM).

Zur Herstellung von Badlösungen mit verschiedenen freien Ca-Konzentrationen im Bereich von $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M und einer konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M bei einer freien Mg-Konzentration von 1 mM wurden die Lösungen AC, AM und B' (Tab. 1) miteinander gemischt. Die Mg-Gesamtkonzentration der Lösung AM entspricht der der Lösung AC. Repräsentiert l den Anteil der Lösung AM am Gesamtvolumen der Mischung und m die Fraktion der Lösung AC, so läßt sich für eine vorgegebene freie Ca-Konzentration die zur Einstellung der konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration benötigte Ba-Gesamtkonzentration ($C_{Ba}$) der Mischung analog zu Gl. (3) berechnen:

$$(12) \quad C_{Ba} = l \cdot C_1 = [Ba^{2+}] + \sum_{i=1}^{3} ((1 + \alpha_{iCa} + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} \cdot C_i \cdot \alpha_{iBa})$$

Entsprechend ergibt sich aus der mit der Fraktion m addierten Ca-Gesamtkonzentration ($C_{Ca}$) die freie Ca-Konzentration dieser Mischung aus der folgenden Gleichung:

$$(13) \quad C_{Ca} = m \cdot C_1 = [Ca^{2+}] + \sum_{i=1}^{3} ((1 + \alpha_{iCa} + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} \cdot C_i \cdot \alpha_{iCa})$$

Zur Einstellung eines konstanten Badvolumens wurde der Mischung ein Volumenanteil (1-l-m) der Lösung B' zugegeben. Die aktuelle $Mg^{2+}$-Konzentration der auf diese Weise hergestellten Badlösungen vom Typ AC/AM/B' mit einer konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration und verschiedenen freien Ca-Konzentrationen weicht nur unwesentlich (< 4 %) von der gewünschten $Mg^{2+}$-Konzentration ab.

Für die Herstellung von $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen wurde die Lösung vom Typ S (Tab. 1) benutzt. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß sie keine Creatinkinase besitzt und anstelle von EGTA oder HDTA (vgl. Kap. 2.3) Di-Kalium-Succinat in gleicher Konzentration enthält. Mit Hilfe dieser modifizierten Lösung von Typ S war es möglich, $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit einer Standard-Ionenzusammensetzung und -Ionenstärke herzustellen, ohne daß eine Präzipitatbildung auftrat (vgl. Kap. 3.1.5). Die zur Herstellung individueller Badlösungen mit definierten freien Mg- und Cd(bzw. Ca)-Konzentrationen benötigten Gesamtkonzentrationen dieser Kationen ($Mg_S$, $Cd_S$, $Ca_S$) wurden analog zu Gl. (4) - (7) für jede einzelne Lösung berechnet und in Form ihrer Chloride zu Lösung S addiert.

$$(14)\quad Mg_S = [Mg^{2+}] + \sum_{i=2}^{3} C_i \cdot \beta_i \cdot (1+\alpha_{iCd}+\alpha_{iCa}+\beta_i)^{-1} + C_5 \cdot \beta_5 \cdot (1+\alpha_{5Cd}+\alpha_{5Ca}+\beta_5)^{-1}$$

$$(15)\quad Cd_S = [Cd^{2+}] + \sum_{i=2}^{3} C_i \cdot \alpha_{iCd} \cdot (1+\alpha_{iCd}+\beta_i)^{-1} + C_5 \cdot \alpha_{5Cd} \cdot (1+\alpha_{5Cd}+\beta_5)^{-1}$$

$$(16)\quad Ca_S = [Ca^{2+}] + \sum_{i=2}^{3} C_i \cdot \alpha_{iCa} \cdot (1+\alpha_{iCa}+\beta_i)^{-1} + C_5 \cdot \alpha_{5Ca} \cdot (1+\alpha_{5Ca}+\beta_5)^{-1}$$

Der Index 5 kennzeichnet die den Liganden Succinat betreffenden Terme (s.o.). Die für die Berechnungen notwendigen apparenten Affinitätskonstanten dieses Liganden für $Mg^{2+}$, $Cd^{2+}$ und $Ca^{2+}$ wurden aus seinen "absoluten" Affinitätskonstanten für diese Ionen (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970) berechnet (s. Kap. 2.3.2).

$Ni^{2+}$-Aktivierungslösungen wurden in ähnlicher Weise aus der Lösung vom Typ N (Tab. 1) hergestellt. Sie enthalten eine höhere $K^+$-Konzentration, weil kein $NiCO_3$ hinreichender Reinheit zur Herstellung von NiEGTA bzw. NiHDTA zur Verfügung stand und deshalb eine doppelt so große Protonenkonzentration mit KOH neutralisiert werden mußte (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1978a).Die übrigen in den $Ni^{2+}$-Aktivierungsexperimenten benutzten Er-

schlaffungs- und Aktivierungslösungen wurden diesen Lösungen durch Zugabe von KCl angepaßt. Zur Einstellung einer bestimmten freien Ni-Konzentration bei einer gegebenen freien Mg-Konzentration wurden zu der Lösung N folgende Gesamtkonzentrationen an $NiCl_2$ und $MgCl_2$ ($Ni_N$ bzw. $Mg_N$) addiert:

$$(17)\quad Ni_N = [Ni^{2+}] + \sum_{i=1}^{4} C_i \cdot \alpha_{iNi}\ (1+\alpha_{iNi}+\beta_i)^{-1}$$

$$(18)\quad Mg_N = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{4} C_i \cdot \beta_i\ (1+\alpha_{iNi}+\beta_i)^{-1}$$

Die apparenten Affinitätskonstanten der Liganden für $Ni^{2+}$ wurden nach SILLÉN & MARTELL (1964, 1970) berechnet (Tab. 2). Da die apparenten Bindungskonstanten von EGTA und HDTA für $Ni^{2+}$ von der freien Ni-Konzentration selbst abhängig sind (s. Kap. 2.3.2), müssen sie für jede freie Ni-Konzentration neu berechnet werden.

Für die Untersuchung der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR der enthäuteten Muskelfaser in Abhängigkeit vom pH wurden Lösungen vom Typ MC und M derart miteinander gemischt, daß die resultierenden Ladungslösungen mit pH-Werten von 6,6-7,6 eine freie Ca-Konzentration von $10^{-6,1}$ M besaßen. Das Mischungsverhältnis, $MC/M \approx 10^{-6,1}\ M \cdot (Kapp_{Ca}^{EGTA})_2$, wird durch die Größe der apparenten Bindungskonstante von EGTA für $Ca^{2+}$ bei dem betreffenden pH, $(Kapp_{Ca}^{EGTA})_2$, bestimmt. Sie wurde nach der Gleichung (19) in Kap. 2.3.2 berechnet. Die Mg-Gesamtkonzentration, die zur Einstellung einer freien Mg-Konzentration von 1 mM zu den Lösungen vom Typ MC/M addiert werden muß, wurde mit der Gl. (6) ermittelt. Die dabei benötigten Bindungskonstanten der Liganden EGTA, ATP und CP wurden der Tab. 2 entnommen bzw. für den entsprechenden pH-Wert nach den Gl. (19) und (20) berechnet. Der gewünschte pH-Wert und die $K^+$-Konzentration dieser Lösung wurden durch adäquate Addition von KOH und KCl eingestellt. Anstelle von TES enthielten die Lösungen vom Typ MC/M den inerten pH-Puffer MOPS (GOOD et al., 1966), der in dem gesamten untersuchten pH-Bereich als pH-Puffer dienen kann (pK = 7,2 bei 20 °C).

### 2.3.2 Die apparenten Affinitätskonstanten der Liganden der Badlösungen für verschiedene divalente Kationen

Eine Voraussetzung für die Herstellung definierter physiologischer Badlösungen für Aktivierungsexperimente an enthäuteten Muskelfasern ist die Kenntnis der Affinitätskonstanten der Liganden der Badlösungen für die vorhandenen Kationen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (s. Kap. 2.3.1). In der Literatur werden für diese Konstanten, insbes. für die Affinitätskonstanten von EGTA und ATP für divalente Kationen, jedoch sehr unterschiedliche Werte angegeben (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970; OGAWA, 1968; GODT, 1974; FABIATO & FABIATO, 1979c; HARAFUJI & OGAWA, 1980).

Darüber hinaus wurden die veröffentlichten Werte unter experimentellen Bedingungen (z.B. Temperatur, Ionenstärke, pH) ermittelt, die sehr verschieden waren von denen in physiologischen Experimenten. Eine Verwendung dieser Affinitätskonstanten in physiologischen Experimenten hat deshalb zur Folge, daß (1) die Versuchsbedingungen nur unzureichend kontrollierbar sind und (2) die Ergebnisse der Experimente nicht eindeutig quantitativ interpretierbar sind. Um diese Probleme in Aktivierungsexperimenten an enthäuteten Muskelfasern auszuschalten, entwickelten MOISESCU & THIELECZEK (1979) einige Methoden, die eine Bestimmung der Affinitätskonstanten bestimmter Liganden unter den jeweils gegebenen experimentellen Bedingungen ermöglichen. Mit Hilfe dieser potentiometrischen Methoden (ausführliche Darstellung bei THIELECZEK, 1977) wurden die in der Tab. 2 zusammengestellten apparenten Affinitätskonstanten von $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Ba^{2+}$ und $Cd^{2+}$ für EGTA, HDTA, ATP und Creatinphosphat in einem Medium bestimmt, das die gewünschte Kationenzusammensetzung enthielt. Diese Konstanten können ohne eine Korrektur bei der Zusammenstellung der entsprechenden Badlösungen verwendet werden (s. Kap. 2.3.1).

Die hier angewendeten relativ einfachen Methoden sind dafür geeignet, die apparenten Bindungskonstanten von divalenten Kationen für verschiedene Liganden in einem weiten Bereich von experimentellen Bedingungen zu bestimmen (s. Tab. 2; vgl. MOISESCU, 1976; MILLER & MOISESCU, 1976; ASHLEY & MOISESCU,

Tabelle 2. Apparente Affinitätskonstanten ($Kapp_X^L$) der Liganden der Badlösungen für $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$ und $Ni^{2+}$

| | | | Experimentelle Bedingungen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ligand (L) | Kation (X) | $Kapp_X^L$ ($M^{-1}$) | $K^+$ (mM) | $Na^+$ (mM) | pH | Temp. (°C) | Bemerkung |
| EGTA | $Mg^{2+}$ | $35 \pm 5$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 10 | |
| | | $46 \pm 6$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 23 | |
| | $Ca^{2+}$ | $(5 \pm 0,5) 10^6$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | gemessen bei pH 5,6-5,8 und extrapoliert auf pH 7,10 |
| | $Sr^{2+}$ | $(2 \pm 0,2) 10^4$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Ba^{2+}$ | $(1,18 \pm 0,2) 10^4$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Cd^{2+}$ | $(3,1 \pm 0,5) 10^{11}$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | gemessen bei pH 3,9-4,0 und extrapoliert auf pH 7,10 |
| | $Ni^{2+}$ | $9,6 \cdot 10^7$ | 237 | 36 | 7,10 | 23 * | |
| HDTA | $Mg^{2+}$ | $8 \pm 1,5$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | * (für $[Ni^{2+}] = 10^{-5}$M) |
| | $Ca^{2+}$ | $6,5 \pm 1$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Sr^{2+}$ | negl. | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Ba^{2+}$ | 3 | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Cd^{2+}$ | $(3 \pm 0,5) 10^4$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |
| | $Ni^{2+}$ | $3,8 \cdot 10^7$ | 237 | 36 | 7,10 | 23 * | (für $[Ni^{2+}] = 10^{-5}$M) |
| ATP | $Mg^{2+}$ | $(6,2 \pm 0,5) 10^3$ | 137 | 36 | 7,10 | 10 | |
| | | $(6,5 \pm 0,5) 10^3$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |
| | $Ca^{2+}$ | $(3,2 \pm 0,2) 10^3$ | 137 | 36 | 7,10 | 10 | |
| | | $(3,4 \pm 0,3) 10^3$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |
| | $Sr^{2+}$ | $(1,4 \pm 0,2) 10^3$ | 137 | 36 | 7,10 | 10-23 | |
| | $Ba^{2+}$ | $450 \pm 50$ | 137 | 36 | 7,10 | 10 | |
| | | $800 \pm 100$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |



Fortsetzung folgende Seite

Fortsetzung Tabelle 2

| Ligand (L) | Kation (X) | $Kapp_X^L$ ($M^{-1}$) | Experimentelle Bedingungen | | | | Bemerkung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $K^+$ (mM) | $Na^+$ (mM) | pH | Temp. (°C) | |
| ATP | $Cd^{2+}$ | $(4 \pm 0{,}5)\ 10^4$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |
| | $Ni^{2+}$ | $8{,}3 \cdot 10^4$ | 237 | 36 | 7,10 | 23 | * (für $[Ni^{2+}] = 10^{-5}$ M) |
| CP | $Mg^{2+}$ | $12 \pm 1{,}5$ | 100-200 | 36 | 6,6-7,6 | 0-23 | |
| | $Ca^{2+}$ | $\leq 20$ | 100-200 | 36 | 6,6-7,6 | 0-23 | |
| | $Sr^{2+}$ | $8 \pm 1{,}5$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Ba^{2+}$ | $15 \pm 1$ | 100-200 | 36 | 7,10 | 0-23 | |
| | $Cd^{2+}$ | $50 \pm 7$ | 137 | 36 | 7,10 | 23 | |
| Succinat | $Mg^{2+}$ | 16 | 137 | 36 | 7,10 | 23 | * |
| | $Ca^{2+}$ | 16 | 137 | 36 | 7,10 | 23 | * |
| | $Cd^{2+}$ | 124 | 137 | 36 | 7,10 | 23 | * |

* Berechnet nach SILLÉN & MARTELL (1964; 1970); alle übrigen Werte wurden mit den Methoden von MOISESCU & THIELECZEK (1979) experimentell bestimmt (s. Text).

Abkürzungen: EGTA = Äthylenglykol-bis(2-aminoathyläther)-N,N'-tetraessigsäure; HDTA = 1,6-Diaminohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; CP = Creatinphosphat; TES = N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoäthansulfonsäure; MOPS = Morpholinopropansulfonsäure; CK = Creatin N-Phosphotransferase.

1977; MOISESCU & THIELECZEK, 1978a;1979; STEPHENSON & WILLIAMS, 1980; 1981). Sie konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zur Bestimmung der apparenten Bindungskonstanten von $Cd^{2+}$ für Succinat und von $Ni^{2+}$ für EGTA und HDTA angewendet werden, weil Succinat im Sinne dieser Methoden nicht titrierbar ist und $Ni^{2+}$ mit EGTA und HDTA neben den gewöhnlichen 1:1-Komplexen einen 2:1-Komplex ($Ni_2$EGTA bzw. $Ni_2$HDTA) bildet (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970), dessen Entstehung ebenfalls nicht titrimetrisch verfolgbar ist. Die apparenten Affinitätskonstanten dieser Ionen und Liganden wurden deshalb aus ihren absoluten Affinitätskonstanten (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970) für die vorliegenden experimentellen Bedingungen nach SILLÉN & MARTELL (1964, 1970) berechnet (s. Tab. 2). Interessanterweise ist aufgrund der 2:1-Komplexbildung von $Ni^{2+}$ mit EGTA und HDTA die apparente Bindungskonstante dieser Liganden für $Ni^{2+}$ von der freien Ni-Konzentration selbst abhängig. In der Tab. 2 sind die für $10^{-5}$ M $Ni^{2+}$ berechneten Werte von $Kapp_{Ni}^{EGTA}$ und $Kapp_{Ni}^{HDTA}$ angegeben.

Für einige Experimente wurden die apparenten Bindungskonstanten von EGTA und ATP für $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ bei verschiedenen pH-Werten benötigt (Kap. 3.2.6). Sie wurden aus den in der Tab. 2 angegebenen, experimentell ermittelten Bindungskonstanten, $(Kapp_X^L)_1$, dieser Liganden (L) EGTA und ATP für die Kationen (X) $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ bei pH 7,10 ($[H^+]_1$) für einen anderen pH-Wert ($[H^+]_2 = [H^+]_1 \cdot 10^{-\Delta pH}$) berechnet. In dem pH-Bereich 6,6-7,6 gilt für die apparente Bindungskonstante von EGTA für $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$, $(Kapp_X^{EGTA})_2$, in guter Näherung (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1979):

$$(19) \qquad (Kapp_X^{EGTA})_2 = (Kapp_X^{EGTA})_1 \cdot 10^{2\Delta pH}$$

Eine entsprechende Betrachtung der apparenten Bindungskonstante von ATP für $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ in diesem pH-Bereich führt zu der Formel:

$$(20) \quad (Kapp_X^{ATP})_2 = ((Kapp_X^{ATP})_1 \cdot (1+K_H[H^+]_1) - K_X(1-10^{\Delta pH})) \cdot (K_H[H^+]_1 + 10^{\Delta pH})^{-1}$$

Darin sind $K_X$ und $K_H$ die jeweils höchsten "absoluten" Affinitätskonstanten von ATP für $Ca^{2+}$ bzw. $Mg^{2+}$ ($K_X$) und für Protonen ($K_H$) (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970; Ref. 56M).

### 2.3.3 Experimentelle Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP in physiologischen Lösungen

In physiologischen $Ba^{2+}$-Lösungen für die Aktivierung der kontraktilen Proteine mit freien Ba-Konzentrationen von $\geq 3.71$ mM trat eine BaATP-Präzipitatbildung auf (s. Kap. 3.1.1). Um die freie Ba-Konzentration auch in diesem, für die $Ba^{2+}$-Aktivierung der Myofibrillenbündel relevanten Bereich kontrolliert variieren zu können (s. Kap. 3.1.1), muß das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP unter den in den Aktivierungslösungen vorliegenden ionalen Bedingungen bekannt sein (s. Kap. 5.2). In der einschlägigen Literatur der physikalischen Chemie und Biochemie waren keinerlei Angaben über die Größe dieser Konstanten zu finden. Es wurde deshalb eine Methode zur experimentellen Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP entwickelt, die die Komplexbildungseigenschaften des Chelators EDTA (Äthylendinitrilo-Tetraessigsäure; SCHWARZENBACH, 1960) mit Ba-Ionen und die pH-metrisch verfolgbare Protonenfreisetzung bei der Bildung dieses Komplexes (MOISESCU & PUSCH, 1975) ausnutzt. Das Prinzip dieser Methode ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

In einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckman) wurde eine Lösung angesetzt, die die gleiche Konzentration an monovalenten Kationen besaß wie die $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen. In dieser Lösung wurde $BaCl_2$ und $Na_2ATP$ in gleicher, zur Bildung eines BaATP-Präzipitates ausreichender Konzentration addiert, so daß der Reaktionsansatz (Volumen $V \approx 10$ ml) folgende Zusammensetzung hatte: $K^+$ = 137 mM, $Na^+$ = 36 mM, TES = 60 mM, pH 7,10, $BaCl_2$ = $Na_2ATP$ = 4-8 mM. Die Zugabe von Ba und ATP in äquivalenten Konzentrationen hat den Vorteil, daß dann die Löslichkeit des schwerlöslichen BaATP-Salzes maximal ist. In Abb. 2 sind exemplarisch zwei Reaktionsansätze mit Ba- und ATP-Gesamtkonzentrationen von 5 mM bzw. 8 mM beschrieben. Nach einer zehnminütigen Äquilibration bei Raumtemperatur (23 °C) hatte sich in diesen Medien ein Bodenkörper gebildet. Um die beiden Phasen dieser heterogenen Systeme effektiv zu trennen, wurden die Reaktionsansätze anschließend für 30 min mit 3000 U/min

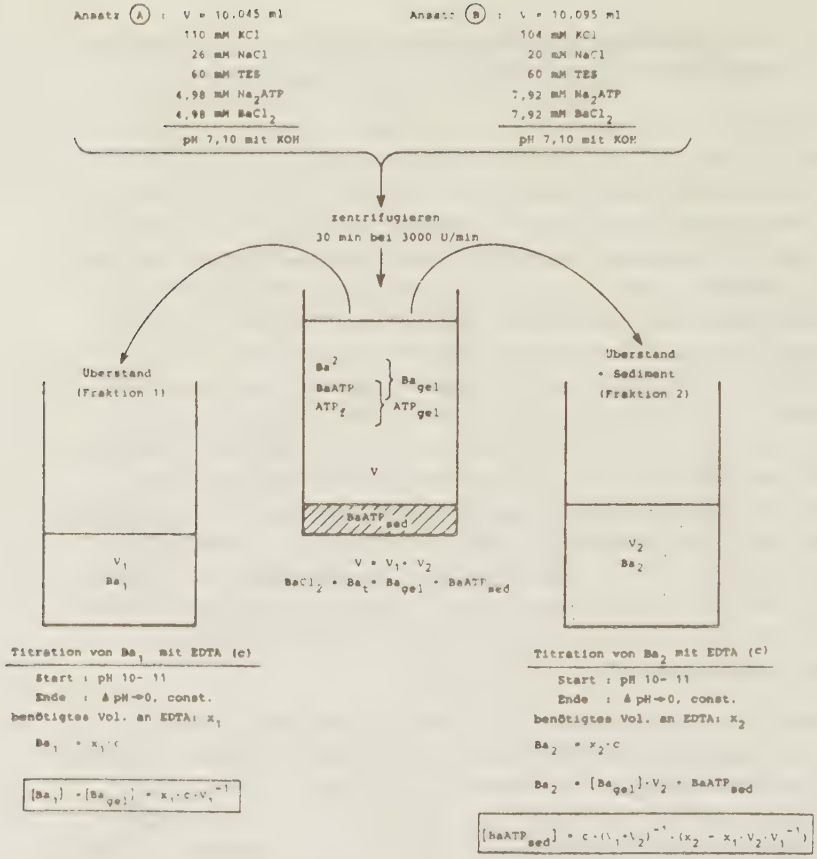



Abb. 2

Schematische Darstellung der Methode zur experimentellen Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP.

Es sind exemplarisch 2 Reaktionsansätze ((A) und (B)) mit verschiedenen Ba- und ATP-Gesamtkonzentrationen dargestellt: $[Ba_t] = [ATP_t] = 4{,}98$ mM (A); 7,92 mM (B). Die Ergebnisse der komplexometrischen Titration der Ba-Gesamtmengen in den beiden Fraktionen (Überstand bzw. Überstand + Sediment) jedes Ansatzes sind in Abb. 3 dargestellt.
Erklärungen im Text. Temp. 23 °C.

bei einer Temperatur von 23 °C zentrifugiert. Die resultierenden Lösungen besitzen ein BaATP-Präzipitat und einen klaren, mit BaATP gesättigten Überstand.

Zur Bestimmung der in der flüssigen Phase vorhandenen Ba-Gesamtmenge ($Ba_1$) wurde dem Überstand ein definiertes Volumen (Fraktion 1, Volumen $V_1$ = 4-6 ml) entnommen und in ein zweites Polyallomergefäß überführt. Die Ba-Gesamtmenge ($Ba_2$) der zurückbleibenden heterogenen Lösung (Fraktion 2, Volumen $V_2$ = $V-V_1$) wurde in dem ursprünglichen Zentrifugenröhrchen bestimmt. Die experimentelle Ermittlung der Ba-Gesamtmengen der beiden Fraktionen erfolgte nach einer potentiometrischen Methode der Ca-Titration mit einem Komplexon (MOISESCU & PUSCH, 1975). Dabei wurde anstelle des bei der Ca-Titration benutzten EGTA das Komplexon EDTA verwendet, weil es eine viel höhere Affinität für $Ba^{2+}$ besitzt (SILLÈN & MARTELL, 1964; 1970). Zunächst wurde der pH der Fraktionen durch Addition von 4-molarer KOH ($\approx$ 50 µl) auf einen Wert zwischen pH 10-11 eingestellt. Anschließend wurde die Ba-Gesamtmenge jeder Fraktion durch sukzessive Zugabe äquivalenter Volumina einer $Na_2EDTA$-Lösung bekannter Konzentration (c = 200 mM) titriert (s. Abb. 3 ). Während der Titration wurden die Fraktionen ständig gleichmäßig gerührt. Die $Na_2EDTA$-Lösung war auf einen pH von 7,5 eingestellt worden, so daß EDTA aufgrund seiner pK-Werte praktisch ausschließlich in der Form $HEDTA^{3-}$ vorlag, die eine hohe Affinität für $Ba^{2+}$ besitzt (SILLÈN & MARTELL, 1964; 1970). Bei der Addition der $Na_2EDTA$-Lösung zu den Fraktionen kommt es daher zu der folgenden Komplexbildungsreaktion

$$HEDTA^{3-} + Ba^{2+} \rightleftharpoons BaEDTA^{2-} + H^{+}$$

durch die dem Gleichgewicht $Ba^{2+} \rightleftharpoons$ BaATP in den Fraktionen fortschreitend Ba-Ionen entzogen werden. In dem pH-Bereich 8,5-10,5, in dem die Ba-Titration durchgeführt wurde (s. Abb. 3 ), besitzt EDTA eine um 3 Größenordnungen höhere absolute Bindungskonstante für $Ba^{2+}$ als ATP (SILLÈN & MARTELL, 1964; 1970). Deshalb kann mit dieser Titrationsmethode letzt-

lich die gesamte Ba-Menge einer Fraktion in BaEDTA überführt werden. Solange in einer Fraktion noch "freies" Ba (d.h. $Ba^{2+}$ + BaATP) vorliegt, resultiert auf eine EDTA-Addition nach der obigen Reaktionsgleichung eine pH-Änderung, die mit Hilfe einer Einstabmeßkette (Ingold, Typ 405-M5) und eines Präzisions-pH-Meters (Knick, Typ 350/34) verfolgt wurde. Der Endpunkt der Titration ist durch einen "Knick" in der Titrationskurve gekennzeichnet (vgl. MOISESCU & PUSCH, 1975), wenn trotz weiterer Addition von EDTA keine bzw. eine relativ geringe konstante pH-Änderung auftritt (s. Abb. 3 ). Gleichzeitig wird die bisher vom aufgerührten BaATP-Niederschlag getrübte heterogene Lösung der Fraktion 2 dauerhaft klar.

Aus dem bei der Titration verbrauchten Volumen $x_i$ ($x_1$ = Fraktion 1, $x_2$ = Fraktion 2) der $Na_2EDTA$-Lösung mit bekannter EDTA-Konzentration (c) ist die für die Ba-Titration benötigte Menge an EDTA bekannt, die der in der betreffenden Fraktion vorliegenden Gesamtmenge an Ba entspricht:

$$Ba_i = x_i \cdot c \qquad (21)$$

Mit Hilfe der Volumina der Fraktionen 1 und 2 ($V_1$, $V_2$) und der ermittelten Werte für $x_1$ und $x_2$ lassen sich die Ba-Gesamtkonzentration in der flüssigen Phase ($[Ba_{gel}]$) und die Konzentration des BaATP-Präzipitates ($[BaATP_{sed}]$) des ursprünglichen Reaktionsansatzes berechnen. Die Ba-Gesamtkonzentration im Überstand des Reaktionsansatzes ist identisch mit der der Fraktion 1, so daß aus Gl. (21 ) sofort folgt:

$$[Ba_{gel}] = x_1 \cdot c \cdot V_1^{-1} \qquad (22)$$

Da in der Fraktion 2 das Volumen der flüssigen Phase viel größer als das des Bodenkörpers war ($V_{fest} \ll V_{flüssig} \approx V_2$), gilt für die Ba-Gesamtmenge der heterogenen Lösung der Fraktion 2:

$$Ba_2 = [Ba_{gel}] \cdot V_2 + BaATP_{sed} \qquad (23)$$

Daraus folgt mit Hilfe von Gl. (21) und (22) für die Menge an präzipitiertem BaATP im Reaktionsansatz:

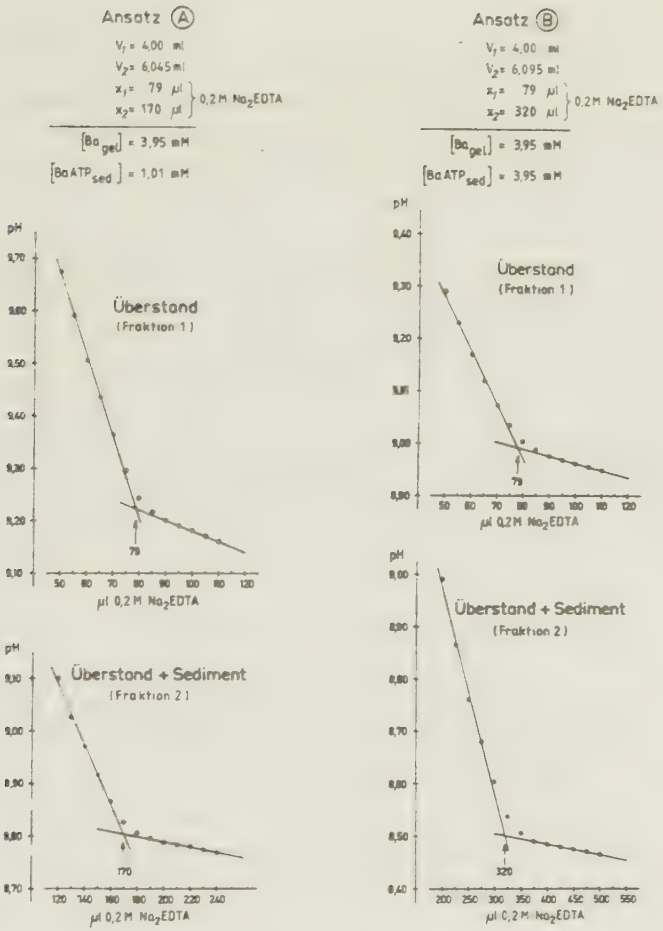



Abb. 3

pH-metrische Titration der Ba-Gesamtmengen der Fraktionen 1 und 2 der Reaktionsansätze (A) und (B) aus Abb. 2 mit EDTA (Temp. 23 °C).

Der Endpunkt der Titration ist jeweils durch einen Pfeil markiert. Über den Titrationskurven jedes Ansatzes sind die zugehörigen ermittelten Werte angegeben.
Erklärungen im Text.

$$(24) \qquad BaATP_{sed} = (x_2 - x_1 \cdot V_2 \cdot V_1^{-1}) \cdot c$$

Damit ergibt sich die Konzentration an BaATP, die aus dem Reaktionsansatz ($V = V_1 + V_2$) ausgefallen ist:

$$(25) \qquad [BATP_{sed}] = (x_2 - x_1 \cdot V_2 \cdot V_1^{-1}) \cdot c \cdot (V_1 + V_2)^{-1}$$

In Abb. 3 sind die Titrationskurven der Ba-Gesamtmengen der Fraktionen von zwei verschiedenen Reaktionsansätzen zusammen mit den experimentell ermittelten Parametern und den daraus nach Gl. (22) und (25) berechneten Werten für $[Ba_{gel}]$ und $[BaATP_{sed}]$ dargestellt. Als Endpunkt der Titration wurde der Schnittpunkt der beiden Tangenten an die Titrationskurve definiert (vgl. MOISESCU & PUSCH, 1975). Die nach dieser Methode ermittelten Werte für die Ba-Gesamtkonzentration der flüssigen Phase sind - unter der Voraussetzung $[Ba_t]/[ATP_t] = \text{const}$ - unabhängig von der Gesamtkonzentration an Ba und ATP ($[Ba_t]$ bzw. $[ATP_t]$) im Ansatz, wie es nach der Theorie erwartet wird:

Ansatz A : $[Ba_t] = [ATP_t] = 4{,}98$ mM; $[Ba_{gel}] = 3{,}95$ mM
Ansatz B : $[Ba_t] = [ATP_t] = 7{,}92$ mM; $[Ba_{gel}] = 3{,}95$ mM

Darüber hinaus ist mit der beschriebenen Methode der Ba-Titration die vorgegebene Gesamtkonzentration an Ba mit 99%iger Genauigkeit experimentell bestimmbar:

| | $[Ba_t]$ vorgegeben | $[Ba_t]$ ermittelt = $[Ba_{gel}] + [BaATP_{sed}]$ |
|---|---|---|
| Ansatz A | 4,98 mM | 4,96 mM |
| Ansatz B | 7,92 mM | 7,90 mM |

Die Titration einer reinen $BaCl_2$-Lösung mit der $Na_2EDTA$-Lösung ergab das gleiche Verhältnis Ba/EDTA = 1/0,99, so daß mit Hilfe der vorgestellten komplexometrisch-pH-metrischen Methode die vorgegebene Ba-Gesamtmenge einer BaATP-Lösung quantitativ bestimmbar ist.

Mit den experimentell ermittelten Werten für $[Ba_{gel}]$ und $[BaATP_{sed}]$ läßt sich nach der in Kap. 5.1 durchgeführten

theoretischen Betrachtung das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP, $Lapp_{Ba}^{ATP}$, unter den im Reaktionsansatz vorliegenden ionalen Bedingungen berechnen. Da bei der experimentellen Bestimmung von $[Ba_{gel}]$ und $[BaATP_{sed}]$ die Voraussetzung $[ATP_t] = [Ba_t]$ erfüllt war, ist das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP durch die Gl.(A22) in Kap. 5.1 gegeben:

$$(26)\quad Lapp_{Ba}^{ATP} = (Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} \cdot ((1+4\cdot[Ba_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2} - 1) \cdot ((1+4 \cdot [Ba_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2} + 1)^{-1} \cdot ([ATP_t] - [BaATP_{sed}])$$

Setzt man Gl. (22) und (25) in diese Gleichung ein, so erhält man $Lapp_{Ba}^{ATP}$ als Funktion der bei der Ba-Titration experimentell ermittelten Parameter $V_1$, $V_2$, $x_1$, $x_2$ und c:

$$(27)\quad Lapp_{Ba}^{ATP} = (Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} \cdot ((1+4\cdot x_1\cdot c\cdot V_1\cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2}-1) \cdot ([ATP_t] - c \cdot (V_1+V_2)^{-1}\cdot(x_2-x_1\cdot V_2\cdot V_1^{-1})) \cdot ((1+4\cdot x_1\cdot c\cdot V_1^{-1}\cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2}+1)^{-1}$$

$[ATP_t]$ in dieser Gleichung wird experimentell vorgegeben und $Kapp_{Ba}^{ATP}$, die apparente Bindungskonstante von ATP für $Ba^{2+}$, ist unter den gleichen ionalen Bedingungen, wie sie im Reaktionsansatz vorlagen, experimentell bestimmt worden (s. Kap. 2.3.2). Mit Hilfe der ermittelten Werte ergibt sich nach Gl. (27) ein apparentes Löslichkeitsprodukt von BaATP für die Bedingungen: 136 mM $K^+$, 36 mM $Na^+$, pH 7,10 ,T = 23 °C, von:

$$Lapp_{Ba}^{ATP} = 2{,}84 \cdot 10^{-6}\ M^2$$

Da die $Ba^{2+}$-Aktivierungsexperimente an Myofibrillenbündeln unter denselben ionalen Bedingungen durchgeführt wurden, konnte diese Konstante ohne eine Korrektur zur Einstellung von kontrollierten freien Ba-Konzentrationen in Aktivierungslösungen, die ein BaATP-Präzipitat enthielten, benutzt werden (s. Kap. 2.3.1 und 5.2).

### 2.3.4 Kontrolle der Ca-Kontamination in EGTA-freien $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen

Die Badlösungen für die Aktivierung des kontraktilen Apparates mit Cd-Ionen enthielten aus den in Kap. 2.3 und 2.3.1 dargelegten Gründen anstelle von $EGTA^{2-}$ $Succinat^{2-}$ als hauptsächliches Anion. Da dessen Affinität für $Ca^{2+}$ jedoch vergleichsweise sehr gering ist (vgl. SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970), wäre die endogene, über die Substanzen eingeschleppte Ca-Kontamination der Lösungen möglicherweise ausreichend gewesen, freie Ca-Konzentrationen von $\geq 3 \cdot 10^{-7}$ M einzustellen, die unter den gewählten experimentellen Bedingungen bereits eine meßbare isometrische Spannung auslösen würden (vgl. MOISESCU, 1976). Um diesen $Ca^{2+}$-Einfluß in den $Cd^{2+}$-Aktivierungsexperimenten auszuschließen, mußte die Ca-Kontamination der Lösungen hinreichend gering gehalten werden. Dazu wurden einige Methoden angewendet, die sich beim Schutze des Photoproteins Aequorin, das eine noch höhere Sensitivität für $Ca^{2+}$ als die kontraktilen Proteine besitzt (BLINKS, PRENDERGAST & ALLEN, 1976), vor Inaktivierung durch eine Ca-Kontamination bewährt haben.

(1) Es wurden nur Substanzen mit einem sehr hohen Reinheitsgrad (pro analysi) und doppelt destilliertes Wasser verwendet.

(2) Anstelle von gewöhnlichen Glasgefäßen, aus denen trotz sorgfältigster Reinigung eine nicht vernachlässigbare Menge von $Ca^{2+}$ in die Lösung austritt, wurden Plastikgefäße aus Polypropylen benutzt, die in dieser Hinsicht unproblematisch sind (JOHNSON & SHIMOMURA, 1978).

(3) Alle Aktivierungs- und Erschlaffungslösungen für diese Experimente wurden aus einer Stammlösung mit 60 mM TES und 50 mM $K_2$Succinat hergestellt, der durch eine Passage durch eine Plastiksäule (Pharmacia K9/60) mit einem Chelator-Ionenaustauscher (Dowex A1, 50-100 mesh; auch bekannt als Chelex 100) mit relativ hoher $Ca^{2+}$-Affinität bei neutralem bis alkalischem pH (BLINKS et al., 1976) das $Ca^{2+}$ entzogen wurde.

Bei der Arbeit mit der Chelatorharz-Säule wurden die Benutzungsempfehlungen von BLINKS, MATTINGLY, JEWELL, VAN LEEUWEN,

HARRER & ALLEN (1978) weitestgehend befolgt. Im einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

(a) Füllen der Säule zu 1/3 mit den in 0,1 N HCl gewaschenen und anschließend mit aqua bidest gespülten Dowex-Perlen;

(b) Überführen der Dowex-Säule in die $K^+$-Form durch Passage von 0,1 N KOH (Eluat: Ca-freies KOH);

(c) Waschen der Dowex-Perlen in einem Plastikgefäß mit HCl und anschließend spülen mit aqua bidest;

(d) pH der Dowex-Aufschlämmung mit Hilfe des Eluates aus (b) auf den Wert 7,0 einstellen;

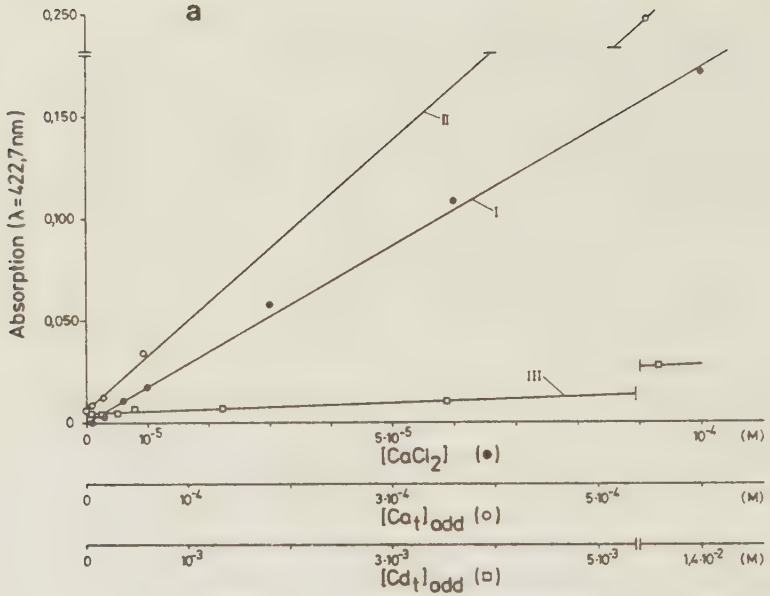
(e) Dowex-Aufschlämmung in die Säule zurückgeben und mit aqua bidest waschen;

(f) Stammlösung (50 mM $K_2$Succinat, 60 mM TES, pH 7,1) auf die Säule geben;

(g) Die ersten Säulenvolumina des Eluates verwerfen; Eluat auffangen, wenn pH (Eluat) = pH (Stammlösung).

Das auf diese Weise gewonnene, praktisch Ca-freie Eluat wurde für die Herstellung der Badlösungen vom Typ S (Tab. 1) für die $Cd^{2+}$-Aktivierungsexperimente verwendet. Die dann noch zu addierenden Substanzen könnten aufgrund ihrer ausgewiesenen garantierten Reinheiten diese Lösung mit einer Ca-Gesamtkonzentration von höchstens $10^{-6}$ M kontaminieren. Berechnet man daraus unter Verwendung der entsprechenden Bindungskonstanten (Tab. 2) die resultierenden freien Ca-Konzentrationen von $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit $Cd^{2+}$-Konzentrationen von $\leq 10^{-4}$ M, so sind diese kleiner als $2{,}3 \cdot 10^{-7}$ M und liegen damit unterhalb der Schwellenkonzentration für die $Ca^{2+}$-aktivierte Kontraktion (s.o.).

Um die tatsächliche Ca-Kontamination der Badlösungen experimentell zu bestimmen, wurden die Ca-Gesamtkonzentrationen der benutzten $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen im Anschluß an die Experimente mit einem Atomabsorptions-Spektrophotometer (Perkin-Elmer 272 mit Probenautomat AS3) gemessen. Für die Kalibration dieser Messungen ist eine mit $CaCl_2$-Lösungen bestimmte Eichkurve nicht geeignet, weil die Badlösungen aufgrund ihrer Zusammensetzung eine andere [Ca]-Absorptions-Charakteristik



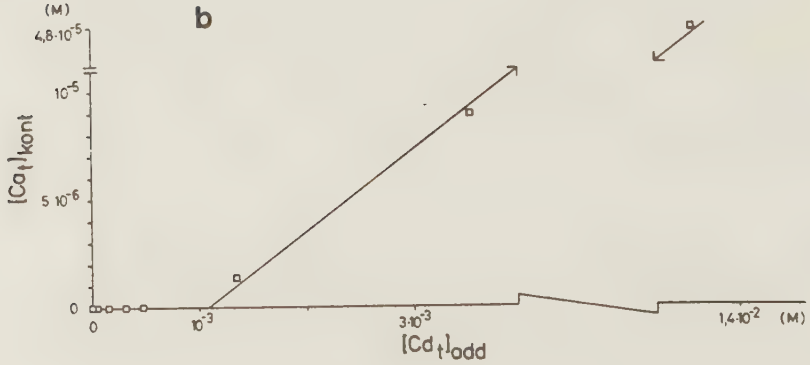




Abb. 4

Text siehe folgende Seite

Abb. 4

(a) Atomabsorptions-spektrophotometrische Messung der Ca-Gesamtkonzentration verschiedener Lösungen:

- ● $CaCl_2$-Eichlösungen
- ○ $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ S mit definierten Ca-Gesamtkonzentrationen ($[Ca_t]_{add}$)
- □ $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ S mit definierten Cd-Gesamtkonzentrationen ($[Cd_t]_{add}$)

Die Regressionsgeraden I-III nach der Gleichung $A_i = a_i X_i + b_i$ (i = I,II,III) beschreiben die Absorption ($A_i$) in Abhängigkeit von der addierten Ca-($X_I$,$X_{II}$) bzw. Cd-Gesamtkonzentration ($X_{III}$). Die zu den jeweiligen Meßwerten gehörende Abszisse ist durch ein entsprechendes Symbol gekennzeichnet.

(b) Ca-Kontamination ($[Ca_t]_{kont}$) der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen in Abhängigkeit von der Cd-Gesamtkonzentration der Lösungen.

Die Punkte wurden aus den entsprechenden Absorptionswerten (⊡) mit Hilfe der Eichkurve II aus Abb. (a) ermittelt. Aus gleichen Absorptionswerten ($A_{II} = A_{III}$) läßt sich aus den Geraden II und III die eingezeichnete theoretische Ca-Kontaminationskurve bestimmen: $[Ca_t]_{kont} \hat{=} X_{II} = (a_{III}X_{III} + b_{III} - b_{II}) \cdot a_{II}^{-1}$. Erklärungen im Text.

besitzen als reine Chlorid-Lösungen. Abb. 4a verdeutlicht die Unterschiede. Sie zeigt eine $CaCl_2$-Eichgerade (Kurve I) zusammen mit einer mit $Ca^{2+}$-Badlösungen vom Typ S aufgenommenen Eichgeraden (Kurve II) und der Geraden, die die Ca-Kontamination der verwendeten Cd-Aktivierungslösungen beschreibt (Kurve III). Die mit $Ca^{2+}$-Badlösungen bestimmte Eichkurve II verläuft im Gegensatz zu der $CaCl_2$-Eichkurve I nicht durch den Ursprung. Das bedeutet, daß die Komponenten der Badlösungen - insbes. die verschiedenen organischen Moleküle und Komplexbildner - eine "Hintergrund-Absorption" verursachen, die nicht auf einen Gehalt der Lösungen an Ca zurückzuführen ist (reine Lösungen der Komponenten der Badlösungen besaßen Absorptionswerte im Bereich der Meßgrenze, d.h. Ca $\lesssim 10^{-6}$ M).

Des weiteren verläuft die mit $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen aufgenommene Eichkurve flacher als die $CaCl_2$-Eichkurve (man beachte die verschiedenen Abszisseneinteilungen der Abb. 4a). Das zeigt, daß im Gegensatz zu einfachen Salzlösungen in Komplexon-haltigen Lösungen nur ein Teil des insgesamt vorhandenen Ca mit einer nicht weiter verfeinerten Atomabsorptionsspektrophotometrischen Meßmethode direkt meßbar ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur Eichung der Messung der Ca-Kontamination der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen (Abb. 4a, Kurve III) anstelle von $CaCl_2$-Lösungen $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ S verwendet, deren Grundzusammensetzung mit der der $Cd^{2+}$-Lösungen identisch ist und deren Ca-Gesamtkonzentration bekannt ist. Unter der Voraussetzung, daß dieselbe Absorption in beiden Typen von Lösungen dieselbe Ca-Gesamtkonzentration repräsentiert, sind dann aus den Absorptionswerten der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit Hilfe der Eichkurve II die entsprechenden Ca-Kontaminationen der $Cd^{2+}$-Lösungen bestimmbar. In Abb. 4b ist die auf diese Weise ermittelte Ca-Gesamtkonzentration der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen in Abhängigkeit von der Cd-Gesamtkonzentration dargestellt. Es ist zu erkennen, daß für Cd-Gesamtkonzentrationen bis zu $\approx 10^{-3}$ M die Ca-Kontamination der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen praktisch unterhalb der Meßgrenze liegt. Erst bei einer Cd-Gesamtkonzentration von

$\approx 1{,}4 \cdot 10^{-3}$ M (das entspricht einer freien Cd-Konzentration von $\approx 3{,}2 \cdot 10^{-5}$ M oder pCd 4,5) erreicht die Ca-Gesamtkonzentration der Badlösung einen Wert von $10^{-6}$ M, der gleichwohl noch einer unterschwelligen freien Ca-Konzentration entspricht (s.o.). Bei der Benutzung von $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit höheren freien Cd-Konzentrationen (pCd $<$ 4,5), die aufgrund ihrer Ca-Kontamination (Abb. 4 b) eine überschwellige $Ca^{2+}$-Konzentration besitzen, muß berücksichtigt werden, daß hier Ca-Ionen zur Spannungsentwicklung des kontraktilen Apparates beitragen können.

# 3. E R G E B N I S S E

## 3.1 Aktivierung des kontraktilen Systems der enthäuteten Skelettmuskelfaser mit divalenten Kationen

Die in Injektionsexperimenten an isolierten Skelettmuskelfasern demonstrierte direkte Aktivierbarkeit des kontraktilen Apparates durch Ba-Ionen (HEILBRUNN & WIERCINSKI, 1947; CALDWELL & WALSTER, 1963; MATSUMURA & MASHIMA, 1976) ist aus den im Kap. 1.4 dargelegten Gründen nicht eindeutig. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse einer quantitativen Untersuchung der $Ba^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung an der enthäuteten Frosch-Skelettmuskelfaser dargestellt. Die dabei verwendeten Badlösungen und experimentellen Bedingungen (s. Kap. 2.3.1) lassen einen direkten Vergleich der Ergebnisse mit Resultaten aus $Ca^{2+}$-Aktivierungen (MOISESCU, 1976) und $Sr^{2+}$-Aktivierungsexperimenten an der enthäuteten Faser (MOISESCU & THIELECZEK, 1979) zu.

In Ergänzung zu diesen Versuchen war es interessant, die aus Aktivierungsexperimenten der myofibrillären ATPase (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972) und Bindungsuntersuchungen des TN-Komplexes (FUCHS, 1974) abgeleitete Hypothese einer Aktivierbarkeit des kontraktilen Systems durch Cd-Ionen (s. Kap. 1.4) an der enthäuteten Muskelfaser experimentell zu überprüfen. Wie später gezeigt wird , läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen die Wirksamkeit einer Ionenart in bezug auf die Aktivierung der Kontraktion in Abhängigkeit von ihrem Ionenradius darstellen. Diese Befunde können mit entsprechenden Daten über die Aktivierung der TN-kontrollierten myofibrillären ATPase (TONOMURA, 1973) und über die Ionenbindung an TN-C (FUCHS, 1974) verglichen werden.

Alle in Experimenten am kontraktilen Apparat der enthäuteten Skelettmuskelfaser verwendeten Aktivierungs- und Erschlaffungslösungen enthielten 10 mM Coffein, um Ionenfluxe, die möglicherweise durch die Aktivität des SR des Präparates verursacht werden könnten, zu minimalisieren (ASHLEY & MOISESCU, 1977). Diese Coffein-Konzentration war in vergleichbaren $Ca^{2+}$- und

$Sr^{2+}$-Aktivierungsexperimenten ausreichend, um meßbare Beeinflussungen der Spannungsentwicklung infolge von Extra-Ionenfluxen über die SR-Membran zu verhindern (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Darüber hinaus verändert Coffein nicht die Steilheit von Aktivierungskurven (STEPHENSON & WILLIAMS, 1980) und hat keine direkte Wirkung auf die Myofilamente (MOSS, 1979).

### 3.1.1 $Ba^{2+}$-induzierte steady-state-Kontraktion (Ba-Aktivierungskurve)

In der Literatur existieren weder Daten über die myofibrilläre $Ba^{2+}$-Konzentration, die zur Auslösung einer "Schwellenkontraktion" nötig ist, noch über die quantitative Beziehung zwischen der $Ba^{2+}$-induzierten steady-state-Kontraktion und der freien Ba-Konzentration. Da jedoch die Aktivität der TN-kontrollierten Actomyosin-ATPase des Skelettmuskels im Bereich von $\approx 10^{-5}$ - $10^{-3}$ M $Ba^{2+}$ mit steigender freier Ba-Konzentration ansteigt (BERSON, 1974), konnte angenommen werden, daß die Ba-Aktivierungskurve für die isometrische Kontraktion ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich verläuft. Für die $Ba^{2+}$-Aktivierungsexperimente wurden Badlösungen mit entsprechenden freien Ba-Konzentrationen mit Hilfe von EGTA hergestellt, das sich aufgrund seiner apparenten Bindungskonstanten für $Ba^{2+}$ (Tab. 2 ) unter diesen Bedingungen als $Ba^{2+}$-Puffer eignet.

Abb. 5a zeigt die mit $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AB/B (Tab. 1 ) ermittelten Ergebnisse aus Experimenten an 15 Myofibrillenbündeln. Es ist die isometrische $Ba^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung ($P_o^{Ba}$) relativ zur maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung ($P_m^{Ca}$) in Abhängigkeit von der freien Ba-Konzentration - ausgedrückt als pBa = $-\log[Ba^{2+}]$ - aufgetragen.

Die "Schwellenkonzentration" für eine meßbare $Ba^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung der enthäuteten Faser liegt bei ca. $10^{-4}$ M $Ba^{2+}$. Der Abb. 5a ist weiterhin zu entnehmen, daß mit Hilfe der $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AB/B, die eine kontrollierte Einstellung freier Ba-Konzentrationen bis hinauf zu 0,7 mM bzw. pBa 3,15 erlauben (s. Kap. 2.3.1), nur

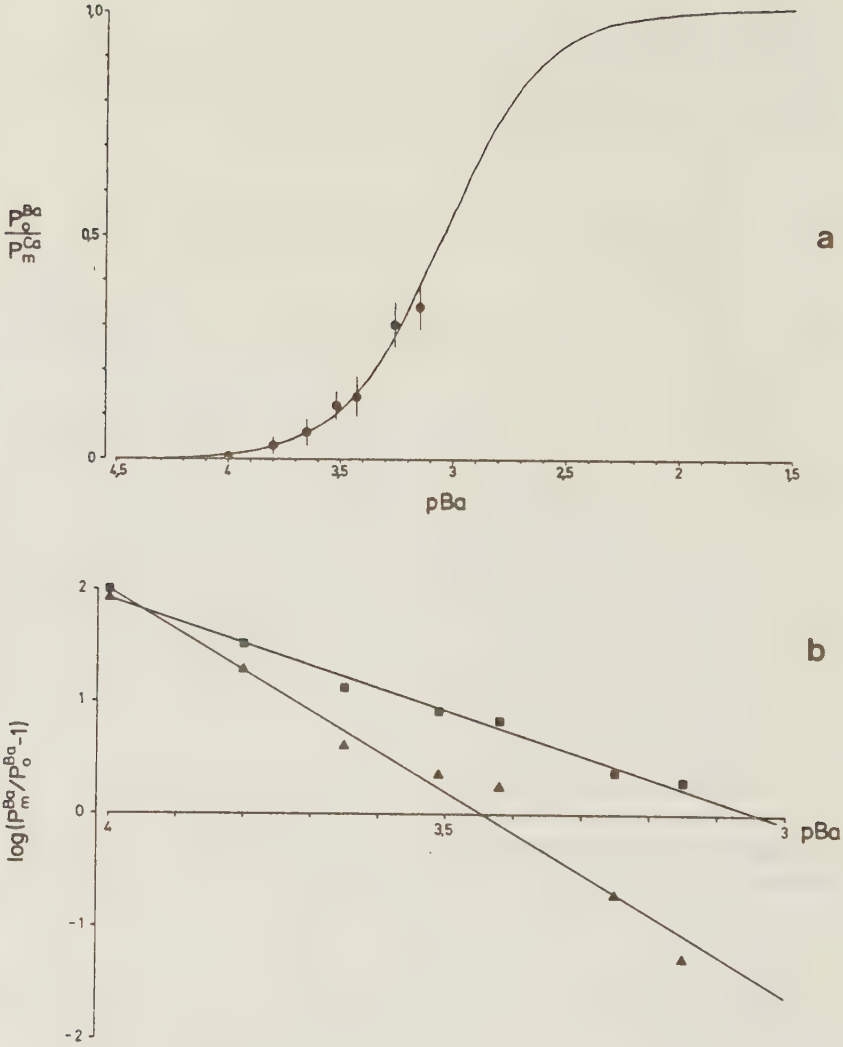



Abb. 5

Text siehe folgende Seite

Abb. 5

(a) $Ba^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung ($P_o^{Ba}$) relativ zur maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung ($P_m^{Ca}$) in Abhängigkeit von pBa bei 1 mM $Mg^{2+}$ (Temp. 23 °C).

Die freien Ba-Konzentrationen bis zu pBa 3,15 wurden mit Lösungen vom Typ AB/B eingestellt. Zur maximalen Aktivierung wurde eine $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B mit pCa 5,22 verwendet. Es sind die Mittelwerte und Streuungen von Ergebnissen aus Experimenten an 15 Präparaten aufgetragen. Die sigmoide Kurve nach der Funktion $P_o^{Ba}/P_m^{Ba} = K' \cdot [Ba^{2+}]^n \cdot (1 + K' \cdot [Ba^{2+}]^n)^{-1}$ mit den Konstanten $n = 2$ und $K' = 1{,}26 \cdot 10^6\ M^{-2}$ stellt die Ba-Aktivierungskurve dar, unter der Voraussetzung, daß die maximale mit $Ba^{2+}$ auslösbare Spannung gleich der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung ist ($P_m^{Ba} = P_m^{Ca}$).

(b) Doppelt-logarithmische Darstellung der Mittelwerte aus Abb. (a) zur Ermittlung des Hill-Koeffizienten n als Steigung der Geradengleichung $\log (P_m^{Ba}/P_o^{Ba} - 1) = n \cdot pBa - \log K'$.

■ Verteilung der experimentellen Werte unter der Voraussetzung $P_m^{Ba} = P_m^{Ca}$. Die Ergebnisse können dann durch eine Regressionsgerade mit der Steigung $n = 2$ beschrieben werden. Dieser Hill-Koeffizient deutet auf eine Beteiligung von mindestens 2 Ba-Ionen pro funktioneller Einheit am Prozeß der Kraftentwicklung hin.

▲ Verteilung der experimentellen Daten unter der Annahme, daß $P_m^{Ba} \approx 0{,}4\ P_m^{Ca}$ ist. In diesem Falle besitzt die Regressionsgerade durch die Punkte eine Steigung von $n = 3{,}6$, die auf eine Stöchiometrie von 4 Ba-Ionen pro funktioneller Einheit bei der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung hindeutet.

höchstens etwa 38 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung ausgelöst werden kann.

Die Beziehung zwischen der relativen $Ba^{2+}$-induzierten isometrischen Spannung - das ist der Quotient aus der steady-state-Spannung $P_o^{Ba}$ und der maximal mit $Ba^{2+}$ induzierbaren Spannung $P_m^{Ba}$ - und der freien Ba-Konzentration, $[Ba^{2+}]$, läßt sich durch die folgende sigmoide Funktion beschreiben (MOISESCU et al., 1975):

$$(E1) \qquad P_o^{Ba} / P_m^{Ba} = K' \cdot [Ba^{2+}]^n \cdot (1 + K' \cdot [Ba^{2+}]^n)^{-1}$$

Der Hill-Koeffizient n bestimmt die Steilheit und die Konstante K' die Lage der Ba-Aktivierungskurve auf der pBa-Achse. Durch Umformen erhält man aus Gl. (E1) eine Geradengleichung für pBa:

$$(E2) \qquad \log (P_m^{Ba}/P_o^{Ba} - 1) = n \cdot pBa - \log K'$$

deren Steigung durch den Hill-Koeffizienten gegeben ist, der die Mindestzahl der am Prozeß der Kraftentwicklung beteiligten Ba-Ionen angibt (MOISESCU et al., 1975; s. Kap. 1.4 ).

Aus der Anwendung dieses mathematischen Formalismus auf die experimentellen Ergebnisse läßt sich jedoch zunächst keine gesicherte Aussage über die Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung ableiten, weil das Verhältnis der maximalen $Ba^{2+}$-induzierten Spannung zur maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung unklar ist. Nimmt man an, daß mit $Ba^{2+}$ dieselbe maximale Spannung wie mit $Ca^{2+}$ auslösbar ist, $P_m^{Ba} = P_m^{Ca}$, so können die experimentellen Daten entsprechend Gl. (E 2) durch eine Gerade mit der Steigung n=2 beschrieben werden (Abb. 5b). Die Kurve in Abb. 5a repräsentiert die zugehörige Ba-Aktivierungskurve, die sich von den unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen ermittelten, durch n=4 charakterisierten Ca- und Sr-Aktivierungskurven (MOISESCU & THIELECZEK, 1979) wesentlich unterscheiden würde.

Hätte dagegen die in Gegenwart von $Ba^{2+}$ reduzierte maximale Actomyosin-ATPase-Aktivität, die nur etwa 40 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten ATPase-Aktivität erreicht (TONOMURA, 1973;

BERSON, 1974), auch eine entsprechende Verminderung der maximal mit $Ba^{2+}$ induzierbaren mechanischen Spannung zur Folge ($P_m^{Ba} = 0,4\ P_m^{Ca}$), so könnten die experimentellen Daten entsprechend Gl. (E2) durch eine Gerade mit der Steigung n=3,6 beschrieben werden (Abb. 5b). Dieser Hill-Koeffizient würde darauf hindeuten, daß, obwohl die maximale durch $Ba^{2+}$ ausgelöste Spannungsentwicklung des kontraktilen Systems kleiner ist als die maximale $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung (vgl. Kap. 1.4 ), allen drei Prozessen dieselbe Stöchiometrie zugrunde liegt. Ein ähnliches Phänomen wurde in Aktivierungsexperimenten an frisch enthäuteten Crustaceen-Muskelfasern entdeckt, wo $Sr^{2+}$ nur höchstens 10 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten isometrischen Spannung auslösen kann, die Stöchiometrie in beiden Fällen jedoch gleich ist (STEPHENSON & WILLIAMS, 1980).

Um klären zu können, welche Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung zugrunde liegt - und damit erste Informationen über den zugehörigen Reaktionsmechanismus zu erhalten - wurden verschiedene Typen von $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen entwickelt, die unter Beibehaltung der Grundzusammensetzung höhere freie Ba-Konzentrationen als 0,7 mM enthielten (s. Kap. 2.3.1). In derartigen Lösungen mit einer Standard-Ionenzusammensetzung trat jedoch bei freien Ba-Konzentrationen von $\gtrsim$ 3,71 mM eine Präzipitatbildung auf, die auf die Ausfällung eines schwerlöslichen BaATP-Salzes (CARDINI & LELOIR, 1957) zurückzuführen war (s. Kap. 2.3.3). Aufgrund der BaATP-Präzipitation wird die freie Ba-Konzentration in diesem für die Untersuchung der $Ba^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung interessanten Konzentrationsbereich ($pBa \lesssim 2,4$; s. Abb. 5a) auch durch die Größe des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP unter den aktuellen Bedingungen bestimmt (s. Kap. 5.2 ). Es wurde deshalb das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP für die in den Lösungen vorliegenden ionalen Bedingungen mit einer eigenen Methode experimentell ermittelt (s. Kap. 2.3.3), um trotz der Präzipitation von BaATP kontrollierte Badlösungen mit den gewünschten hohen freien Ba-Konzentrationen herstellen zu können (s. Kap. 2.3.1).

Abb. 6 a,b,c zeigt maximale Aktivierungen der enthäuteten Muskelfaser in BaATP-präzipitathaltigen Badlösungen mit freien Ba-Konzentrationen von 12,6 mM (pBa 1,9) und 14 mM (pBa 1,85) in Gegenwart von 1 mM bzw. 3 mM $Mg^{2+}$. Zum Vergleich ist daneben die jeweils an demselben Präparat mit $Ca^{2+}$ ausgelöste maximale isometrische Spannung bei 1 mM $Mg^{2+}$ dargestellt (Abb. 6b,d,f). Wie zu erkennen ist, wird bei einer freien Mg-Konzentration von 1 mM mit freien Ba-Konzentrationen von 12,6 - 14 mM dieselbe maximale steady-state-Spannung erreicht, die mit $Ca^{2+}$ auslösbar ist. In Gegenwart von 3 mM $Mg^{2+}$ werden durch 14 mM $Ba^{2+}$ ca. 97 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung ausgelöst (Abb. 6 e,f).

Um diese Ergebnisse abzusichern, mußten jedoch zusätzlich die folgenden Probleme geklärt werden, die sich aus der Notwendigkeit zur Modifikation der ursprünglichen $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen (s.o.) ergaben. Die Konzentration an MgATP, dem Substrat der Myosin-ATPase (vgl. WEBER et al., 1969), ist in den Badlösungen zur maximalen $Ba^{2+}$-Aktivierung wegen der Präzipitation von BaATP im Vergleich zu den $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen verringert. Sie sinkt jedoch nicht unter $\approx$ 1,5 mM (berechnet mit den Gleichungen aus Kap. 5.2 ) und wird durch das ATP-regenerierende System der Lösung (s. Kap. 2.3 ) gepuffert, so daß eine Beeinflussung der Spannungsentwicklung durch eine MgATP-Verarmung im Präparat nicht zu erwarten ist (GODT, 1974). Darauf deutet auch die experimentell durch MgATP-Verarmung in Mg-freien Badlösungen induzierte Rigorspannung der Myofibrillenbündel hin (Abb. 6g). Diese entwickelt sich mit einer 200 mal größeren Halbwertszeit als die $Ba^{2+}$-induzierte Kraft (Abb. 6a,c,e) und erreicht im steady-state nur ca. 60 % der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung (Abb. 6h), so daß eine Beteiligung von Rigorspannung an den $Ba^{2+}$-induzierten Spannungstransienten ausgeschlossen werden kann.

Ein zweites Problem ergab sich aus der geringen Ca-Pufferkapazität der $Ba^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ CH (Tab. 1 ), aufgrund derer eine Ca-Kontamination der Badlösung zur beob-

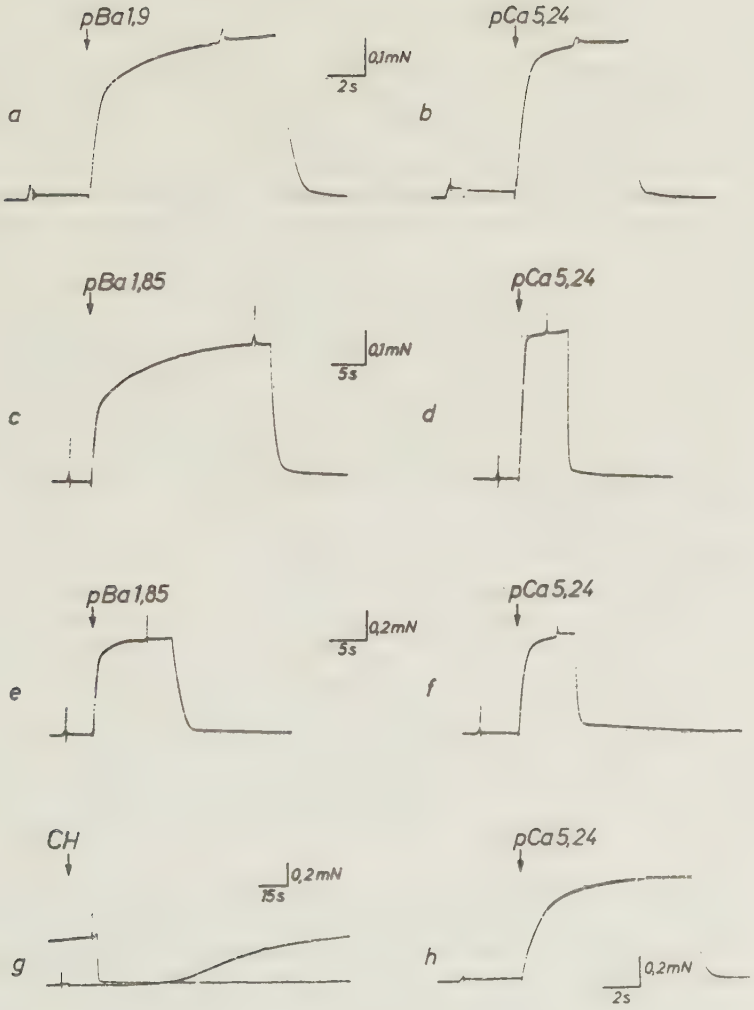



Abb. 6

Text siehe folgende Seite

Abb. 6
Vergleich der maximal mit Ca- und Ba-Ionen induzierbaren isometrischen Spannungen enthäuteter Muskelfasern

Spannungstransienten nach Aktivierung der enthäuteten Muskelfaser in Badlösungen vom Typ CH mit 12,6 mM $Ba^{2+}$ (pBa 1,9; a) und vom Typ CE mit 14 mM $Ba^{2+}$ (pBa 1,85; c, e) und 1 mM $Mg^{2+}$ (a, c) und 3 mM $Mg^{2+}$ (e) im Vergleich zur maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung in Lösungen vom Typ AC/B (pCa 5,24) mit 1 mM $Mg^{2+}$ (b, d, f, h). (g) Entwicklung von Rigorspannung in einer Lösung ohne Mg vom Typ CH.
Die nebeneinander stehenden Spannungstransienten wurden jeweils an ein und demselben Präparat ermittelt. Vor jeder Aktivierung (Pfeil) wurde das Myofibrillenbündel für 3 min entweder in einer Lösung vom Typ H/B = 500/1 (pCa > 8) mit 0,1 mM EGTA (b, d, f, g, h) oder vom Typ H/AM = 150/1 mit 0,33 mM EGTA und $8 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ (a, c, e) inkubiert. Eine Kalibrierungsmarke zwischen zwei nebeneinanderliegenden Spannungstransienten gilt für das betreffende Paar.

Präparatabmessungen (Ø in µm/Länge in mm):
60/2,1 (a, b); 50/1,9 (c, d, e, f); 60/1,9 (g, h).
Temp. 23 °C.

achteten Spannungsentwicklung der enthäuteten Faser hätte beitragen können (Abb. 6a). Jedoch entwickelte sich in der $Ba^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ CE (Tab. 1), in der die durch eine eventuelle Ca-Kontamination eingestellte freie Ca-Konzentration wegen der hohen EGTA-Konzentration (50 mM) sicher weit unterhalb der "Schwelle" für eine Aktivierung des kontraktilen Apparates liegt (pCa >7), dieselbe maximale isometrische Spannung (Abb. 6c). Damit ist bewiesen, daß eine maximale Aktivierung des kontraktilen Systems der Muskelfaser durch Ba-Ionen dieselbe isometrische Spannung auslöst wie eine maximale $Ca^{2+}$-induzierte Aktivierung.

Vergleicht man den Zeitverlauf der maximalen $Ba^{2+}$- und $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung miteinander, so fällt auf, daß die $Ba^{2+}$-abhängigen Transienten (Abb. 6a,c,e) eine schnelle und eine langsame Phase besitzen, während die $Ca^{2+}$-induzierten Transienten (Abb. 6b,d,f) durch eine einzige Zeitkonstante, die etwa der der schnellen $Ba^{2+}$-abhängigen Phase entspricht, angenähert werden können. Die langsame Phase der $Ba^{2+}$-induzierten Transienten ist auf eine entsprechend langsame Äquilibration der freien Ba-Konzentration im Präparat zurückzuführen, weil die für die maximale $Ba^{2+}$-Aktivierung verwendeten Badlösungen wegen ihres relativ hohen Anteils an ungepuffertem $Ba^{2+}$ (s. Kap. 2.3.1) den Endwert der freien Ba-Konzentration im gesamten Faserquerschnitt nur langsam einstellen können (s. Kap. 3.1.3). Im Gegensatz dazu erfolgt die Äquilibration der freien Ba-Konzentration im Präparat bei submaximalen Aktivierungen mit Badlösungen vom Typ AB/B so schnell, daß sie die Spannungsentwicklung selbst nicht beeinflußt (s. Kap. 3.1.3).

In Abb. 7 ist eine vollständige, mit Hilfe von Badlösungen vom Typ AB/B und CH ermittelte Ba-Aktivierungskurve in Gegenwart einer freien Mg-Konzentration von 1 mM dargestellt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Experimenten an 9 Präparaten aufgetragen. Die Einzelmessungen wurden jeweils an interpolierten maximalen Kontrollkontraktionen bei pCa 5,24 normalisiert. Es ist zu erkennen, daß der kontraktile Apparat

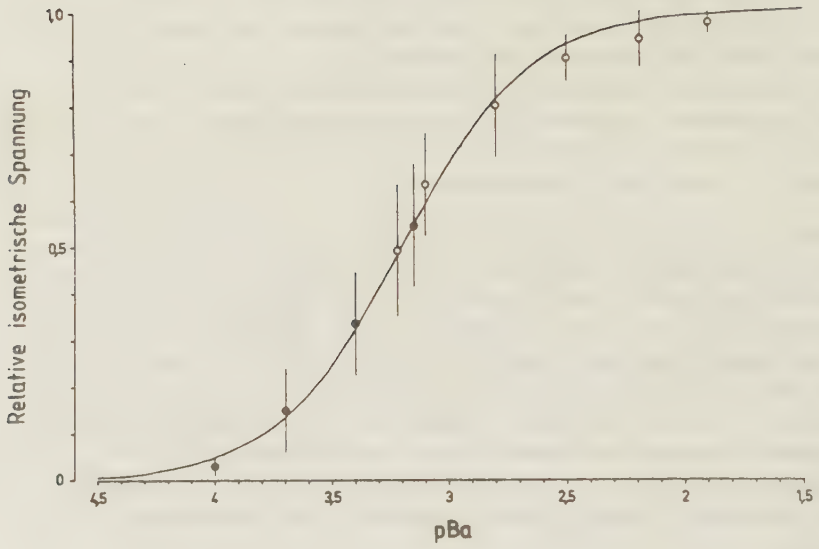



Abb. 7

Vollständige Ba-Aktivierungskurve von Frosch-Myofibrillenbündeln bei einer freien Mg-Konzentration von 1 mM (Temp. 23 °C).

Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Ergebnissen aus Experimenten an 9 verschiedenen Präparaten dargestellt. Die freien Ba-Konzentrationen wurden entweder durch Lösungen vom Typ AB/B (●) oder vom Typ CH (o) eingestellt. Die sigmoide Kurve für die relative Spannung $P_r$ folgt der Funktion $P_r = (k \cdot [Ba^{2+}])^n \cdot (1 + (k \cdot [Ba^{2+}])^n)^{-1}$ mit den Konstanten $k = 1{,}58 \cdot 10^3\ M^{-1}$ und $n = 1{,}6$.

der enthäuteten Muskelfaser im $Ba^{2+}$-Konzentrationsbereich von $pBa \leq 2,2$ die maximale isometrische Spannung entwickelt. Die experimentellen Daten können gut durch die nach Gl. (E1) mit einem Hill-Koeffizienten von n=1,6 gezeichnete theoretische Kurve angenähert werden. Das deutet darauf hin, daß der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung eine Stöchiometrie von 2 Ba-Ionen pro funktioneller Einheit des Kontraktionsmechanismus zugrunde liegt. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, weil es im Gegensatz zu steady-state-Resultaten aus $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aktivierungsexperimenten an enthäuteten Fasern unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen (MOISESCU, 1976; MOISESCU & THIELECZEK, 1979) steht, aus denen eine Beteiligung von jeweils 4 aktivierenden Ionen am Prozeß der Spannungsentwicklung hervorgeht.

Dieser Vergleich einer auf "Durchschnittswerten" von mehreren Myofibrillenbündeln basierenden Ba-Aktivierungskurve mit Ca- und Sr-Aktivierungskurven individueller enthäuteter Fasern ist allerdings nicht unproblematisch. MOISESCU & THIELECZEK (1979) zeigten nämlich, daß Aktivierungskurven, die auf Ergebnissen von mehr als einem Präparat beruhen, aufgrund einer Variabilität in den Sensitivitäten der individuellen kontraktilen Systeme eine reduzierte Steilheit aufweisen und damit die der Kraftentwicklung zugrundeliegende Stöchiometrie verschleiern können (vgl. auch BRANDT et al., 1980). Es wurde deshalb versucht, vollständige Ba-Aktivierungskurven von ein und demselben Myofibrillenbündel zu erhalten, was nicht so einfach gelang wie im Falle der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aktivierungen, da die Präparate in Gegenwart von Ba-Ionen nicht so langlebig waren. Abb.8(Ba) zeigt eine individuelle Ba-Aktivierungskurve, die auf den steady-state-Werten der für eine kinetische Analyse der $Ba^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung benutzten Spannungstransienten in Abb. 10 basiert. Für einen direkten Vergleich enthält die Abb. 8 noch zusätzlich Ca- und Sr-Aktivierungskurven individueller enthäuteter Fasern desselben Muskels.

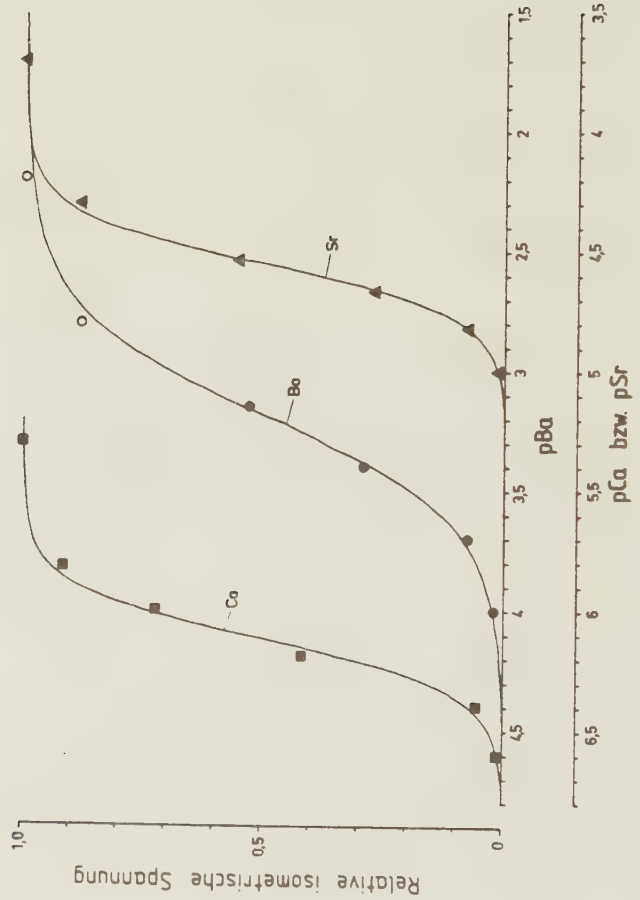



Abb. 8

Text siehe folgende Seite

Abb. 8

Ba-, Ca- und Sr-Aktivierungskurven individueller Frosch-Myofibrillenbündel bei 1 mM $Mg^{2+}$ (Temp. 23 °C).

(Ba) Ba-Aktivierungskurve mit einem Hill-Koeffizienten n=2, ermittelt mit Badlösungen vom Typ AB/B (●) und CH (o). Es gilt die obere Abszisse. Die theoretische Kurve für die relative $Ba^{2+}$-induzierte Spannung folgt der Funktion $P_r = K_1K_2[Ba^{2+}]^2 \cdot (1 + K_1[Ba^{2+}] + K_1K_2[Ba^{2+}]^2)^{-1}$ mit den Gleichgewichtskonstanten $K_1 = 70\ M^{-1}$ und $K_2 = 3{,}5 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Diese Gleichung für die relative Spannung ergibt sich, wenn die Spannungsentwicklung (P) die Folge der Bindung von 2 Ba-Ionen in einer konsekutiven Reaktion an die regulatorische Einheit (R) der kontraktilen Einheit des Kontraktionsmechanismus ist (s. Kap. 3.1.3):

$$Ba^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} BaR + Ba^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ba_2R \quad \propto \quad P$$

Die gemessenen Spannungstransienten, die diesen Ergebnissen zugrunde liegen, sind in Abb. 10 (Kap. 3.1.3) dargestellt.

(Ca), (Sr) Typische Ca- bzw. Sr-Aktivierungskurve ((Ca) bzw. (Sr)) mit einem Hill-Koeffizienten n=4, ermittelt mit Badlösungen vom Typ AC/B (■, (Ca)) bzw. AS/B (▲, (Sr)). Für diese Daten gilt die untere Abszisse. Die sigmoiden Kurven folgen der Funktion $P_r^X = K_X \cdot [X^{2+}]^4 \cdot (1 + K_X[X^{2+}]^4)^{-1}$ mit den Konstanten $K_X = 3{,}02 \cdot 10^{24}\ M^{-4}$ für X=Ca und $K_X = 1{,}58 \cdot 10^{18}\ M^{-4}$ für X=Sr.

Präparatabmessungen (Ø in µm/Länge in mm): 80/2,2 (Ba); 50/1,6 (Ca); 70/1,9 (Sr).

Die Ca- und Sr-Aktivierungskurven zeigen eine Konzentrationsabhängigkeit, wie sie aus früheren Untersuchungen bekannt ist (MOISESCU & THIELECZEK, 1979), und sind durch die Funktion (E1) mit einem Hill-Koeffizienten von n=4 beschreibbar. Dagegen ist die individuelle Ba-Aktivierungskurve zwar etwas steiler (n=2) als die entsprechende aus Durchschnittswerten ermittelte Aktivierungskurve (Abb. 7 ), verläuft jedoch deutlich flacher als die beiden anderen Aktivierungskurven. Vergleicht man die zur Einstellung der halbmaximalen steady-state-Spannung benötigten freien Konzentrationen der verschiedenen aktivierenden Kationen ($Ca_{0,5}$, $Sr_{0,5}$, $Ba_{0,5}$) miteinander, so ergibt sich aus Abb. 8 ein Verhältnis von $Ca_{0,5}$ : $Sr_{0,5}$ : $Ba_{0,5}$ = 1 : 36 : 870. Das bedeutet, daß die Empfindlichkeit des kontraktilen Systems der Skelettmuskelfaser für Ca-Ionen etwa 36-mal so hoch ist wie für Sr-Ionen und um einen Faktor 870 höher ist als für Ba-Ionen. Für einen Anstieg der relativen isometrischen Spannung von 10% auf 90% des Maximalwertes muß die $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Konzentration um den Faktor 2,95 und die freie Ba-Konzentration um den Faktor 9,1 erhöht werden. Dieses Verhältnis dokumentiert die im Falle der $Ba^{2+}$-induzierten Aktivierung verringerte Steilheit der Aktivierungskurve und damit die Reduktion des Hill-Koeffizienten von 4 auf 2. Gemäß der Darstellung von MOISESCU et al. (1975) gibt jedoch der Hill-Koeffizient lediglich Auskunft über die Mindestzahl der am Prozeß der Kraftentwicklung beteiligten Ionen. Die steady-state-Untersuchung läßt deshalb offen, ob die offenbar veränderte Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung Ausdruck eines in Gegenwart von $Ba^{2+}$ veränderten Reaktionsschemas ist. Detailliertere Informationen über den Reaktionsmechanismus lassen sich aus einer Untersuchung der Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung ableiten, die in Kap.3.1.3 dargestellt ist.

### 3.1.2 Einfluß von $Mg^{2+}$ auf die Ba-Aktivierungskurve

Der inhibitorische Einfluß einer Erhöhung der freien Mg-Konzentration auf die Beziehung zwischen der relativen isometrischen Spannung enthäuteter Muskelfasern und der freien Ca-Konzentration ist häufig beschrieben worden (EBASHI et al., 1969; ASHLEY & MOISESCU, 1974; 1977; DONALDSON & KERRICK, 1975; vgl. Kap. 1.4). Unerklärlich ist bis heute der Befund, daß die Aktivität der myofibrillären ATPase, die nach der Querbrückentheorie der Kontraktion (vgl. Kap. 1.3) mechanistisch eng mit der mechanischen Spannungsentwicklung verknüpft sein muß, nicht durch die freie Mg-Konzentration beeinflußt wird (POTTER & GERGELY, 1975; GRABAREK et al., 1981). In neueren Untersuchungen wurde die Vorstellung entwickelt, daß nur die $Ca^{2+}$-spezifischen Bindungsplätze des TN-Komplexes (vgl. Kap. 1.3) an der Regulation der Kontraktion beteiligt sind (JOHNSON et al., 1979), während die $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsplätze und die $Mg^{2+}$-specific sites (vgl. Kap. 1.3) möglicherweise für die funktionsfähige Quartärstruktur der Regulatorproteine wichtig sind (POTTER & GERGELY, 1975).

Wie aus den steady-state-Untersuchungen hervorgeht, erfordert die $Ba^{2+}$-abhängige Spannungsentwicklung im Gegensatz zur $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-induzierten Kontraktion unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen die Bindung von nur 2 aktivierenden divalenten Kationen an die kontraktile Einheit. Aufgrund der Tatsache, daß sich Mg-Ionen nur an eine der beiden Klassen von $Ca^{2+}$-Bindungsstellen binden können, versprach eine Untersuchung der $Mg^{2+}$-Wirkung auf die $Ba^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung Informationen darüber zu liefern, welche 2 der 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-Komplexes in diesem Fall für die Kraftentwicklung verantwortlich sind. Trifft die Hypothese von JOHNSON et al. (1979) zu (s.o.), so sollte die $Ba^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung nicht durch eine Änderung der $Mg^{2+}$-Konzentration beeinflußt werden, weil sich die Ba-Ionen an die $Ca^{2+}$-spezifischen Bindungsplätze binden müssen, um eine Kontraktion auslösen zu können.

Abb. 9 zeigt zwei auf Durchschnittswerten basierende Ba-Aktivierungskurven in Gegenwart von 1 mM und 3 mM $Mg^{2+}$. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Experimenten an 11 verschiedenen Myofibrillenbündeln aufgetragen. Die Ba-Aktivierungskurve unter Normalbedingungen (1 mM $Mg^{2+}$) ist der entsprechenden Kurve in Abb. 7 in ihrer Lage und ihrem Verlauf sehr ähnlich. Das zeigt, daß die experimentellen Bedingungen mit Hilfe der verschiedenen Aktivierungslösungen, die in diesen Experimenten zur Anwendung kamen (vgl. die Legenden der Abb. 7 und 9 ), sehr gut kontrolliert werden konnten. Die mit Badlösungen vom Typ CE/B und CE ermittelten experimentellen Daten in Abb. 9 lassen sich für jede der beiden freien Mg-Konzentrationen durch eine theoretische Kurve nach der Gl. (E1) mit einem Hill-Koeffizienten von n=1,4 beschreiben. Eine Erhöhung der freien Mg-Konzentration von 1 mM auf 3 mM führt bei einer konstanten Konzentration der monovalenten Kationen zu einer signifikanten Parallelverschiebung (t-Test für kleine Stichproben; 1 %-Niveau) der Ba-Aktivierungskurve in die Richtung höherer freier Ba-Konzentrationen. Um in Gegenwart von 3 mM $Mg^{2+}$ dieselbe relative isometrische Spannung auszulösen wie im Falle von 1 mM $Mg^{2+}$, ist eine um den Faktor 1.5 höhere $Ba^{2+}$-Konzentration nötig. Die maximale induzierbare Kraft wird für beide $Mg^{2+}$-Konzentrationen bei einer freien Ba-Konzentration von 14 mM (pBa 1,85) erreicht. Eine vergleichbare Beeinflussung der Aktivierungskurve durch die freie Mg-Konzentration ist auch für die $Ca^{2+}$-Aktivierung (ASHLEY & MOISESCU, 1977) und $Sr^{2+}$-Aktivierung (DONALDSON & KERRICK, 1975; THIELECZEK, 1977) des kontraktilen Systems beschrieben worden. Der Befund, daß die Form der Ba-Aktivierungskurve und die maximal induzierbare Kraft durch die Änderung der $Mg^{2+}$-Konzentration nicht verändert wird, deutet auf eine kompetitive Hemmung der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung durch Mg-Ionen hin (vgl. DONALDSON & KERRICK, 1975). Daraus folgt, daß die Ba- und Mg-Ionen um dieselben Bindungsplätze am TN-Komplex konkurrieren, die wegen der Affinität von $Mg^{2+}$ zu nur einer der beiden Klassen von $Ca^{2+}$-Bindungsstellen als die $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites des TN-C identifiziert werden

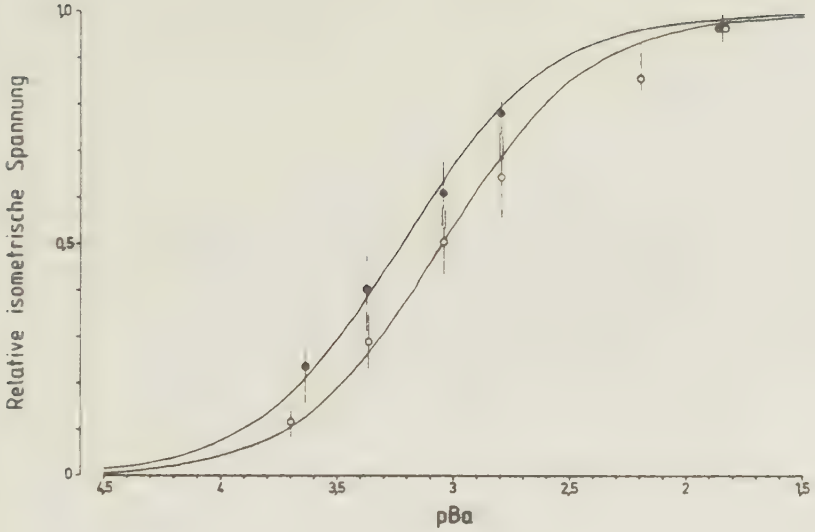



Abb. 9

Beziehung zwischen der relativen $Ba^{2+}$-induzierten steady-state-Spannung und pBa in Abhängigkeit von der freien Mg-Konzentration (1 mM $Mg^{2+}$ ●; 3 mM $Mg^{2+}$ ○).

Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Ergebnissen aus Experimenten an 11 verschiedenen Präparaten dargestellt. Die freien Ba-Konzentrationen wurden mit Lösungen vom Typ CE/B und CE eingestellt (s. Kap. 2.3.1). Die sigmoiden Kurven folgen der Funktion für die relative Spannung $P_r = (k[Ba^{2+}])^n \cdot (1 + (k[Ba^{2+}])^n)^{-1}$ mit den Konstanten n = 1,4 und $k = 1{,}7 \cdot 10^3\ M^{-1}$ bei 1 mM $Mg^{2+}$ und $k = 1{,}14 \cdot 10^3\ M^{-1}$ bei 3 mM $Mg^{2+}$. Temp. 23 °C.

können. Entgegen der Vorstellung von JOHNSON et al. (1979) scheinen also - zumindest was die $Ba^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung betrifft - die $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C an den Reaktionen, die zur Kraftentwicklung führen, wesentlich beteiligt zu sein.

Aus der durch die Variation der $Mg^{2+}$-Konzentration verursachten Verschiebung der Ba-Aktivierungskurve um 0,18 logarithmische Einheiten lassen sich die apparenten Affinitätskonstanten der $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsstellen für Ba- und Mg-Ionen unter den gegebenen ionalen Bedingungen berechnen. Repräsentiert S die betreffende Klasse von Bindungsplätzen, um die $Ba^{2+}$ und $Mg^{2+}$ konkurrieren, so können die Gesamt-Bindungsreaktionen am einfachsten folgendermaßen formuliert werden:

(E3) $\quad 2\ Ba^{2+} + S \overset{K'_{Ba}}{\rightleftharpoons} Ba_2S \propto P$

(E4) $\quad 2\ Mg^{2+} + S \overset{K'_{Mg}}{\rightleftharpoons} Mg_2S$

$K'_{Ba}$ und $K'_{Mg}$ sind die apparenten Affinitätskonstanten der Bindungsklasse für Ba- bzw. Mg-Ionen. S stellt die Konzentration der unbesetzten und $Ba_2S$ und $Mg_2S$ die Konzentration der voll mit $Ba^{2+}$ bzw. $Mg^{2+}$ besetzten Bindungsklasse im Gleichgewichtszustand dar. Die vom kontraktilen Apparat entwickelte steady-state-Spannung P sei aufgrund der ermittelten Stöchiometrie von 2Ba-Ionen pro kontraktiler Einheit proportional zur Konzentration der mit $Ba^{2+}$gesättigten Bindungsklasse. Sie erreicht ihren Maximalwert ($P=P_{max}$), wenn alle Bindungsstellen der Bindungsklasse mit Ba-Ionen besetzt sind. Für die relative isometrische Spannung $P_r$ gilt dann:

(E5)

$$P_r = P \cdot (P_{max})^{-1} = Ba_2S \cdot (Ba_2S_{max})^{-1} = Ba_2S \cdot (S+Ba_2S+Mg_2S)^{-1}$$

Wendet man auf die Gln. (E3) und (E4) das Massenwirkungsgesetz an und setzt die entsprechenden Terme in Gl. (E5) ein, so folgt für die relative Spannung:

$$(E6) \quad P_r = K^* \cdot [Ba^{2+}]^2 \cdot (1 + K^* \cdot [Ba^{2+}]^2)^{-1}$$

$$(E7) \quad K^* = K'_{Ba} \cdot (1 + K'_{Mg} \cdot [Mg^{2+}]^2)^{-1}$$

Die Konstante K* stellt die für $Mg^{2+}$ korrigierte apparente Affinitätskonstante der kontraktilen Einheit für Ba-Ionen dar und bestimmt die Lage der Ba-Aktivierungskurve auf der pBa-Achse in Abhängigkeit von der freien Mg-Konzentration. Die Werte für K* können für jede der beiden $Mg^{2+}$-Konzentrationen ($[Mg_1^{2+}]$ = 1 mM, $[Mg_2^{2+}]$ = 3 mM) über die aus den Kurven in Abb. 9 ablesbaren halbmaximalen Spannungen nach der Gl. (E6) berechnet werden. Man erhält dann das folgende Gleichungssystem:

$$(E8) \quad K_1^* = K'_{Ba} \cdot (1 + K'_{Mg} \cdot [Mg_1^{2+}]^2)^{-1}$$

$$(E9) \quad K_2^* = K'_{Ba} \cdot (1 + K'_{Mg} \cdot [Mg_2^{2+}]^2)^{-1}$$

aus dem sich die gesuchten apparenten Affinitätskonstanten $K'_{Ba}$ und $K'_{Mg}$ der Klasse der $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsstellen für Ba- und Mg-Ionen einfach berechnen lassen. Für diese Konstanten ergeben sich aus den experimentellen Daten die Werte $K'_{Ba} \approx 3{,}4 \cdot 10^6\ M^{-2}$ und $K'_{Mg} \approx 1{,}8 \cdot 10^5\ M^{-2}$. Die apparente Bindungskonstante des kontraktilen Systems der Froschmuskelfaser für $Mg^{2+}$ ist danach unter vergleichbaren Bedingungen um etwa eine Größenordnung kleiner als die der Barnacle-Muskelfaser, deren physiologische Kraftentwicklung durch eine Stöchiometrie von 2 Ca-Ionen pro kontraktiler Einheit gekennzeichnet ist (ASHLEY & MOISESCU, 1977).

### 3.1.3 Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung

Die Ergebnisse der steady-state-Aktivierung des kontraktilen Apparates mit Ca- und Sr-Ionen deuten darauf hin, daß diese beiden Ionenarten an denselben Reaktionsschritten im Prozeß der Spannungsentwicklung der Muskelfaser beteiligt sind (s. Kap. 3.1.1; vgl. auch MOISESCU & THIELECZEK, 1979). Dagegen scheinen Ba-Ionen aufgrund der veränderten Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung (s. Kap. 3.1.1) nicht an allen Reaktionsschritten der Reaktionssequenz, die zur Kraftentwicklung führt, beteiligt zu sein. Detailliertere Informationen über die Art und Weise, wie die Ba-Ionen in den Reaktionsmechanismus des kontraktilen Apparates eingreifen, lassen sich aus einer Untersuchung der Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung gewinnen (vgl. MOISESCU, 1976). Eine solche kinetische Untersuchung der Kraftentwicklung ist jedoch nur möglich, wenn gewährleistet ist, daß die freie Ba-Konzentration im Präparat nach einem Lösungswechsel viel schneller äquilibriert, als sich die Spannung des Myofibrillenbündels entwickelt (MOISESCU, 1976; GRIFFITHS, KUHN, GÜTH & RÜEGG, 1979). Bei der kinetischen Untersuchung der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung enthäuteter Froschmuskelfasern war diese Voraussetzung nur dann erfüllt, wenn bei niedrigen Temperaturen gearbeitet wurde (MOISESCU, 1976). Dagegen entwickelt sich die $Ba^{2+}$-induzierte Spannung enthäuteter Fasern vergleichsweise langsam (Abb. 10 a-e), so daß diese Untersuchung bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte.

Die Abb. 10 a-e zeigt $Ba^{2+}$-induzierte Spannungstransienten von ein und demselben Myofibrillenbündel bei Aktivierung in Badlösungen vom Typ AB/B und CH (Tab. 1) nach vorausgegangener Äquilibration in einer Lösung vom Typ H/B=500/1 mit 0,1 mM EGTA. Die Vorinkubation des Präparates in der Badlösung mit der geringen $Ba^{2+}$-Pufferkapazität (geringe EGTA-Konzentration) gewährleistet bei der anschließenden Aktivierung in stark $Ba^{2+}$-gepufferten Aktivierungslösungen (50 mM EGTA) eine schnelle

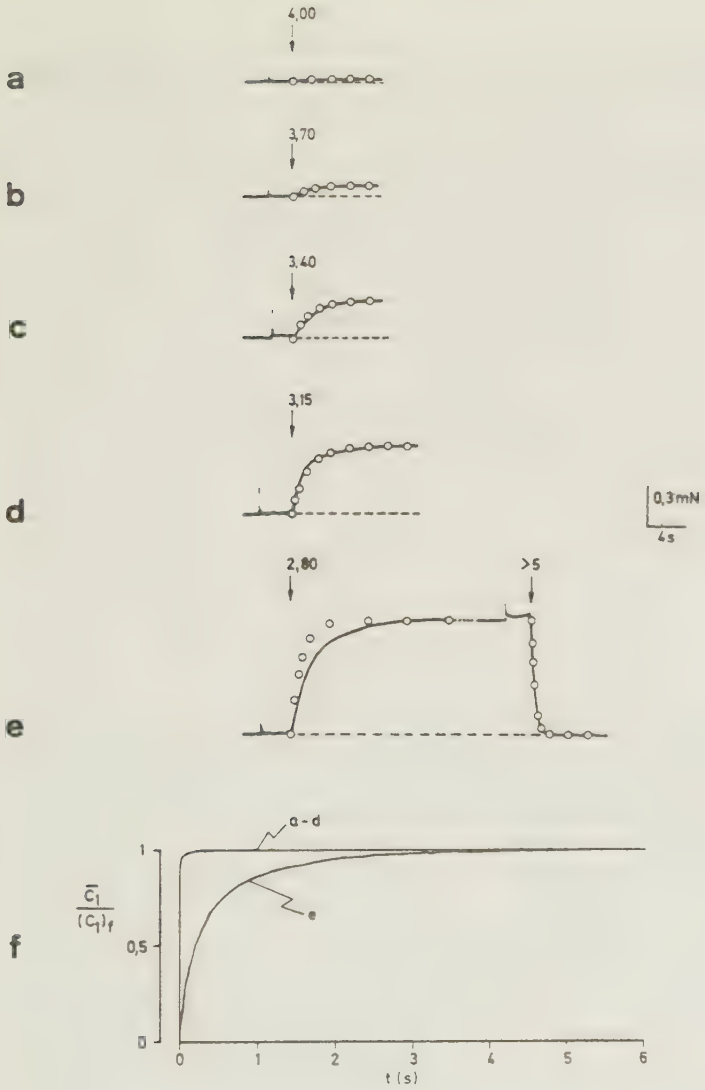



Abb. 10

Text siehe folgende Seite

Abb. 10

Zeitverlauf von isometrischen $Ba^{2+}$-induzierten Spannungstransienten und deren Beschreibung durch das vorgestellte kinetische Modell

(a-e) Zeitverlauf von isometrischen $Ba^{2+}$-induzierten Spannungstransienten desselben Myofibrillenbündels wie in Abb. 8 (Ba). Vor jeder Aktivierung (Pfeil) in einer Aktivierungslösung vom Typ AB/B (a-d) und CH (e) mit dem angegebenen pBa-Wert wurde das Präparat für 3 min in einer Badlösung vom Typ H/B=500/1 mit 0,1 mM EGTA äquilibriert.

(e) Erschlaffung des Präparates in einer Badlösung vom Typ B (pBa > 5) nach 3-minütiger Aktivierung in einer $Ba^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ CH (pBa 2,80).
Die in die Spuren eingezeichneten Punkte stellen den von dem vorgestellten konsekutiven Reaktionsschema für den betreffenden pBa-Wert vorausgesagten Zeitverlauf der Spannungsentwicklung (a-e) und Erschlaffung (e) dar (s. Text).

(f) Theoretischer Zeitverlauf der Äquilibration der durchschnittlichen freien Ba-Konzentration im gesamten Präparat ($\overline{C}_1$) relativ zur freien Ba-Konzentration der Badlösung ($(C_1)_f$) bei einer Aktivierung mit Lösungen vom Typ AB/B mit pBa 4,00-3,15 (Kurve a-d) und CH mit pBa 2,80 (Kurve e) nach vorausgegangener Äquilibration in einer Lösung vom Typ H/B=500/1 mit 0,1 mM EGTA (s. Text).

Präparatabmessungen: Ø 80 µm, Länge 2,2 mm. Temp. 23 °C.

Äquilibration der freien Ba-Konzentration im gesamten Querschnitt des Präparates (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a; s. Kap. 2.3). Der Zeitverlauf dieses Vorgangs läßt sich abschätzen über eine Betrachtung der Diffusion von Ba-Ionen und derjenigen Substanzen der $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen aus dem Bad in das Präparat hinein, die aufgrund ihrer Affinität für $Ba^{2+}$ die freie Ba-Konzentration im Myofibrillenbündel wesentlich bestimmen.

Nähert man das Präparat durch einen Zylinder mit dem Radius des Präparates ($r_o$) an, in dem die Diffusionsvorgänge nur in radialer Richtung auftreten, so ist die durchschnittliche Konzentration $\bar{C}_i(t)$ der relevanten Substanzen ($\bar{C}_1 = [Ba^{2+}]$, $\bar{C}_2 = [BaEGTA]$, $\bar{C}_3 = [EGTA]$, $\bar{C}_4 = [BaATP]$, $\bar{C}_5 = [ATP]$) im Präparat zum Zeitpunkt t (> 50 ms) in guter Näherung gegeben durch (JOST, 1960):

$$(E10)\quad \bar{C}_i(t) = (C_i)_f + ((C_i)_a - (C_i)_f) \cdot 4 \cdot \left(\sum_{\nu=1}^{5} \gamma_\nu^{-2} \cdot \exp(-\gamma_\nu^2 \cdot D_i \cdot t \cdot r_o^{-2})\right)$$

$$\text{für } 0 < r < r_o \text{ und } t = 0 : \bar{C}_i(t) = (C_i)_a$$

$$\text{für } r = r_o \text{ und } t \geq 0 : \bar{C}_i(t) = (C_i)_f$$

Darin ist $(C_i)_a$ die Anfangskonzentration der betreffenden Substanz im Präparat, die mit der Konzentration dieser Substanz in der der Aktivierung vorangestellten Badlösung identisch ist, und $(C_i)_f$ ist die Endkonzentration, die der Konzentration dieser Substanz in der Aktivierungslösung entspricht. $D_i$ bezeichnet den radialen Diffusionskoeffizienten der betreffenden Substanz im Myofibrillenbündel ($D_1 = D_{Ba}$, $D_2 = D_{BaEGTA}$, $D_3 = D_{EGTA}$, $D_4 = D_{BaATP}$, $D_5 = D_{ATP}$) und $\gamma_\nu$ kennzeichnet die Wurzeln der Gleichung $J_o(x) = 0$, wobei $J_o(x)$ die Besselfunktion nullter Ordnung ist ($\gamma_1 = 2{,}405$; $\gamma_2 = 5{,}520$; $\gamma_3 = 8{,}654$; $\gamma_4 = 11{,}792$; $\gamma_5 = 14{,}931$; aus CHISTOVA, 1959).

Die freie Ba-Konzentration innerhalb des Myofibrillenbündels während der Diffusionsvorgänge wird zu jeder Zeit i.W. von dem Verhältnis der Ba-Gesamtkonzentration zur Konzentration der $Ba^{2+}$-

Puffer EGTA und ATP im myofibrillären Raum [illegible]. Unter der Voraussetzung, daß sich für die Bindungsreaktion von $Ba^{2+}$ mit diesen Liganden sehr schnell ein Gleichgewicht einstellt, d.h. das ional im myofibrillären Raum vorliegende $Ba^{2+}$ stets im Gleichgewicht mit dem an die Liganden gebundenen $Ba^{2+}$ steht, ist die durchschnittliche freie Ba-Konzentration im Präparat zum Zeitpunkt t ($\bar{C}_1(t)$) aus der folgenden Bilanzgleichung für die Ba-Gesamtkonzentration im Myofibrillenbündel zur Zeit t, $(\bar{C}_1)_{ges}(t)$, mit Hilfe von Gl. (E10) berechenbar:

$$(E11)\quad (\bar{C}_1)_{ges}(t) = \bar{C}_1(t) + \bar{C}_2(t) + \bar{C}_3(t)$$

$$= \bar{C}_1(t) + \bar{C}_1(t)\cdot Kapp_{Ba}^{EGTA}\cdot(\bar{C}_2(t)+\bar{C}_3(t)) \cdot$$

$$(1 + \bar{C}_1(t)\cdot Kapp_{Ba}^{EGTA} + [Mg^{2+}]\cdot Kapp_{Mg}^{EGTA})^{-1} +$$

$$\bar{C}_1(t)\cdot Kapp_{Ba}^{ATP}\cdot(\bar{C}_4(t)+\bar{C}_5(t)) \cdot$$

$$(1 + \bar{C}_1(t)\cdot Kapp_{Ba}^{ATP} + [Mg^{2+}]\cdot Kapp_{Mg}^{ATP})^{-1}$$

Die apparenten Affinitätskonstanten von EGTA und ATP für $Ba^{2+}$ und $Mg^{2+}$ sind der Tab. 2 zu entnehmen, und $[Mg^{2+}]$ ist die freie Mg-Konzentration in diesen Experimenten.

In Abb. 10f ist der mit Hilfe der Gl. (E10) und (E11) berechnete Zeitverlauf der Äquilibration der durchschnittlichen freien Ba-Konzentration im gesamten Präparat ($r_o$ = 40 µm) in relativen Einheiten ($\bar{C}_1$ = $(\bar{C}_1)_t$) dargestellt. Für die radialen Diffusionskoeffizienten im Myofibrillenbündel wurden dabei folgende Werte angenommen: $D_1 = 1{,}25 \cdot 10^{-5}$ cm$^2$ s$^{-1}$ (ROBINSON & STOKES, 1959); $D_2 = D_3 = D_{CaEGTA} = 4{,}6 \cdot 10^{-6}$ cm$^2$ s$^{-1}$ (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a); $D_4 = D_5 = 3 \cdot 10^{-6}$ cm$^2$ s$^{-1}$ (KUSHMERICK & PODOLSKY, 1969).

Die Abb. 10 f zeigt, daß bei Aktivierungen mit EGTA-gepufferten Badlösungen vom Typ AB/B (pBa 4,0-3,15) bereits nach 320 ms mehr als 99 % der externen freien Ba-Konzentration im gesamten Präparat eingestellt ist (Kurve a-d). Dagegen erreichen die durch diese freien Ba-Konzentrationen ausgelösten Spannungstransienten (Abb. 10 a-d) wesentlich langsamer ihr steady-state-Niveau. Man darf desnalb annehmen, daß sich die Spannung der Myofibrillenbündel im pBa-Bereich 4,0-3,15 infolge der praktisch stufenartigen Erhöhung der freien Ba-Konzentration unlimitiert durch die $Ba^{2+}$-Äquilibration entwickelt.

Im Gegensatz dazu erreicht die durchschnittliche freie Ba-Konzentration im Myofibrillenbündel im Falle der Aktivierung in einer schwach Ba-gepufferten Badlösung vom Typ CH (pBa 2,80) erst nach ca. 5 s den Wert der Badlösung (Abb. 10 f, Kurve e). Der zugehörige Spannungstransient (Abb. 10 e) äquilibriert in etwa demselben Zeitintervall, so daß Aktivierungen des Präparates im pBa-Bereich 3,15-2,8 mit Badlösungen vom Typ CH nicht die Voraussetzungen für eine kinetische Analyse der Spannungsentwicklung erfüllen (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a).

Diese Lösungen waren jedoch wichtig für eine hinreichend schnelle Erniedrigung der freien Ba-Konzentration im interfilamentären Raum, die für die Messung einer unbeeinflußten Relaxation des aktivierten Präparates im Rahmen der kinetischen Untersuchung nötig ist (MOISESCU, 1976). Überführt man das Präparat, nachdem es seine Gleichgewichtsspannung in einer Lösung vom Typ CH mit pBa 2,80 erreicht hat, in eine Relaxationslösung vom Typ B mit 30 mM EGTA (Abb. 10e), so sollte nach der obigen Abschätzung die durchschnittliche freie Ba-Konzentration im Präparat bereits nach 80 ms auf einen unterschwelligen Wert ($<10^{-5}$ M) gesunken sein. Die resultierende Spannungsabnahme (Abb. 10e), die deutlich schneller verläuft als die Spannungsentwicklung bei pBa 4,0-3,15 (Abb. 10a-e), kann durch eine einfache exponentielle Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $-2,3\ s^{-1}$ angenähert werden. Sie erfolgt damit mehr

viel langsamer als die Abnahme der freien Ba-Konzentration in der Umgebung der Myofilamente und kann deshalb ebenfalls zur kinetischen Analyse der $Ba^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung herangezogen werden.

Den kinetisch analysierbaren Spannungstransienten (Abb. 10a-d) ist zu entnehmen, daß die Zeit, die nötig ist, um 50 % der steady-state-Spannung zu erreichen (Halbwertszeit $t_{50}$), im pBa-Bereich 4,0-3,4 mit steigender freier Ba-Konzentration kontinuierlich zunimmt (pBa 4,0:$t_{50} \approx 0,7$ s; pBa 3,7:$t_{50} \approx 1,0$ s; pBa 3,4:$t_{50} \approx 1,2$ s). Interessanterweise wird die Halbwertszeit bei einer höheren freien Ba-Konzentration jedoch wieder kleiner (pBa 3,15:$t_{50} \approx 1,1$ s). Die $Ba^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung der enthäuteten Frosch-Skelettmuskelfaser hat in dieser Hinsicht eine wesentlich andere Charakteristik als die $Ca^{2+}$-aktivierte Spannungsentwicklung enthäuteter Skelettmuskelfasern des Frosches (MOISESCU, 1976) und der Ratte (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981), deren Halbwertszeiten mit zunehmender $Ca^{2+}$-Konzentration kontinuierlich abnehmen. Sie ähnelt dagegen sehr stark der $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung enthäuteter langsamer (slow twitch) Skelettmuskelfasern der Ratte, deren Halbwertszeiten bei $Ca^{2+}$-Konzentrationen, die steady-state-Spannungen von ca. 40 % der maximalen isometrischen Spannung auslösen, ebenfalls ein Maximum durchlaufen (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981). Die aus den steady-state-Spannungen in Abb. 10a-e ableitbare Ba-Aktivierungskurve ist in Abb. 8 dargestellt. Ihre Steilheit ist ebenso wie die der Ca-Aktivierungskurve langsamer twitch-Muskelfasern (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981) geringer als die der Ca-Aktivierungskurve schneller Skelettmuskelfasern und durch einen Hill-Koeffizienten von 2 charakterisierbar (s. Kap. 3.1.1).

Weitere quantitative Informationen über den Prozeß der $Ba^{2+}$-aktivierten Kraftentwicklung lassen sich aus einem einfachen kinetischen Reaktionsschema ableiten, das alle gemessenen Spannungstransienten hinreichend gut annähert (ASHLEY & MOISESCU, 1972; 1977; MOISESCU, 1976). Das einfachste Reaktionsschema, das die $Ba^{2+}$-induzierten Spannungstransienten (Abb. 10a-d) akkurat beschreiben kann und dabei mit der durch den Hill-

Koeffizienten der Ba-Aktivierungskurve gegebenen Mindestzahl von 2 Ba-Ionen pro funktioneller kontraktiler Einheit (s. Kap. 3.1.1) und einer minimalen Anzahl von intermediären Reaktionsschritten auskommt, kann folgendermaßen formuliert werden:

$$\text{(E12)}\quad Ba^{2+} + R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} BaR + Ba^{2+} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} Ba_2R \propto P$$

Darin ist R die regulatorische Einheit der Skelettmuskelfaser, $k_1$, $k_{-1}$, $k_2$, $k_{-2}$ sind die Geschwindigkeitskonstanten und P ist die resultierende isometrische Spannung. Ein derartiges Reaktionsschema wurde bereits zur Beschreibung der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung von Barnacle-Muskelfasern benutzt (ASHLEY & MOISESCU, 1972; 1977) und als "konsekutives Schema" bezeichnet, um deutlich zu machen, daß das zweite Ba-Ion erst nach dem ersten gebunden werden kann. Der Zeitverlauf der Spannungsentwicklung (P(t)) infolge einer stufenartigen Erhöhung der freien Ba-Konzentration von einem unterschwelligen auf einen gegebenen Wert, $[Ba^{2+}]$, ergibt sich aus Gl. (E12) als Bruchteil der maximalen isometrischen Spannung $P_o$ (RODIGUIN & RODIGUINA, 1964):

$$\text{(E13)}\quad P(t)/P_o = P_r \cdot (1+\beta_2(\beta_1-\beta_2)^{-1} \cdot \exp(-\beta_1 t) + \beta_1(\beta_2-\beta_1)^{-1} \cdot \exp(-\beta_2 t))$$

$P_r$, die relative $Ba^{2+}$-induzierte isometrische Spannung im Gleichgewichtszustand, ist gegeben durch:

$$\text{(E14)}\quad P_r = K_1 \cdot K_2 \cdot [Ba^{2+}]^2 \cdot (1+K_1[Ba^{2+}]+K_1K_2\cdot[Ba^{2+}]^2)^{-1}$$

Die Konstanten $K_1 = k_1/k_{-1}$ und $K_2 = k_2/k_{-2}$ können aus der Ba-Aktivierungskurve (Abb. 8(Ba)) ermittelt werden, die durch die Gl. (E14) beschrieben wird. Ihre Werte betragen $K_1 = 70\ M^{-1}$ und $K_2 = 3.5 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Die Hilfsvariablen $\beta_1$ und $\beta_2$ in Gl. (E13) sind die Wurzeln mit umgekehrten Vorzeichen der folgenden quadratischen Gleichung (RODIGUIN & RODIGUINA, 1964):

(E15)

$$\beta^2 + \beta(k_{-1} + k_{-2} + k_1[Ba^{2+}] + k_2[Ba^{2+}]) + k_{-1}k_{-2} + k_1k_{-2}[Ba^{2+}] + k_1k_2[Ba^{2+}]^2 = 0$$

Da die entwickelte isometrische steady-state-Spannung nach der eingeführten Reaktionsgleichung (E12) proportional zur relativen Anzahl der im Gleichgewichtszustand mit 2Ba-Ionen besetzten Bindungsstellen ist, gibt eine plötzliche Entfernung der aktivierenden Ba-Ionen aus diesem Reaktionsgleichgewicht Auskunft über die Größe der Geschwindigkeitskonstante $k_{-2}$ (s. Schema (E12)). Sie entspricht der Geschwindigkeitskonstanten der bei diesem experimentellen Schritt resultierenden Relaxation der Spannung (Abb. 10e). Über die Beziehung für die Gleichgewichtskonstante $K_2$ der zweiten $Ba^{2+}$-Bindungsreaktion (s.o.) ist damit auch die Geschwindigkeitskonstante $k_2$ bekannt. Die übrigen kinetischen Parameter wurden so gewählt, daß sie die beste Anpassung an die experimentellen Daten (Abb. 10a-d) ergaben. Ihre Werte sind

$$k_1 = 5{,}25 \cdot 10^2\ M^{-1}\ s^{-1}; \qquad k_2 = 8{,}05 \cdot 10^4\ M^{-1}\ s^{-1}$$

$$k_{-1} = 7{,}5\ s^{-1}; \qquad k_{-2} = 2{,}3\ s^{-1}$$

Mit Hilfe dieser kinetischen Parameter wurden die in die Spannungstransienten eingezeichneten Punkte in Abb. 10a-e nach Gl. (E14) und (E15) berechnet. Man sieht, daß der durch das kinetische Schema für pBa 4,0-3,15 vorausgesagte Zeitverlauf der Spannungsentwicklung gut mit den gemessenen Spannungstransienten übereinstimmt (Abb. 10a-d). Die Ursache dafür, daß bei einer Aktivierung mit pBa 2,80 der gemessene Spannungstransient langsamer verläuft als nach dem kinetischen Modell erwartet (Abb. 10e), liegt darin, daß in diesem Falle die $Ba^{2+}$-Äquilibration im Präparat die Spannungsentwicklung limitiert (s.o.).

Bemerkenswerterweise kann das vorgestellte konsekutive Reaktionsschema auch die Beobachtung voraussagen, daß bei submaximalen Aktivierungen mit $Ba^{2+}$-Konzentrationen, die weniger als 40-50 % der maximalen isometrischen Spannung auslösen, die Zeit bis zum Erreichen der steady-state-Spannung mit zunehmender $Ba^{2+}$-Konzentration zunimmt und bei einer weiteren Erhöhung der $Ba^{2+}$-Konzentration wieder abnimmt (s.o.). Auch

die Beziehung zwischen der relativen isometrischen steady-state-Spannung und pBa kann nach dem konsekutiven Reaktionsschema mit den ermittelten Parametern beschrieben werden (Abb.8(Ba)). Die Ergebnisse dieser kinetischen Untersuchung zeigen, daß die $Ba^{2+}$-induzierte Kontraktion quantitativ erklärt werden kann, wenn jedes der beiden aus den steady-state-Ergebnissen geforderten Ba-Ionen an einem separaten Reaktionsschritt einer konsekutiven Reaktion, die zur Spannungsentwicklung führt, beteiligt ist.

### 3.1.4 Einfluß von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung

Die Ergebnisse der Untersuchung der steady-state-Aktivierung (Kap. 3.1.1) und der Kinetik der Spannungsentwicklung (Kap. 3.1.3) haben ergeben, daß die Bindung von 2 Ba-Ionen an die regulatorische Einheit des Kontraktionsmechanismus notwendig und hinreichend ist, um die $Ba^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung der kontraktilen Einheit der Muskelfaser quantitativ erklären zu können. Diese 2 Ba-Ionen reagieren wahrscheinlich mit den zwei $Mg^{2+}$-sensitiven (Ca-Mg-sites) der 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-Komplexes (s. Kap. 1.3), da $Mg^{2+}$ eine kompetitive Hemmung der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung verursacht (Kap. 3.1.2). Man kann allerdings die Ergebnisse der $Ba^{2+}$-induzierten steady-state-Aktivierung auch erklären, wenn man annimmt, daß die Ba-Ionen mit denselben Bindungsstellen der regulatorischen Einheit reagieren wie die Ca-Ionen; d.h., daß wie im Falle der $Ca^{2+}$-induzierten Kontraktion (s. Kap. 3.1.1) die Bindung von Ba-Ionen an alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Regulationsmechanismus eine Voraussetzung für die Kraftentwicklung ist. Um unter dieser Voraussetzung die experimentell beobachtete Abhängigkeit der relativen isometrischen Spannung von pBa zu erhalten (Abb. 7 und 8), muß man annehmen, daß 2 der 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen eine relativ hohe Affinität für $Ba^{2+}$ besitzen (s. Kap. 5.3). Darüber hinaus muß eine intermediäre $Ba^{2+}$-Bindungsreaktion (s. Kap. 5.3) eine relativ geringe Gleich-

gewichtskonstante besitzen, damit die Kooperativität der aktivierten Bindungsstellen, die in der Steilheit der Aktivierungskurven zum Ausdruck kommt (vgl. KOSHLAND, 1970), wie beobachtet im Falle der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion geringer ist (n=2) als bei der $Ca^{2+}$-induzierten Aktivierung (n=4) der enthäuteten Muskelfaser (s. Kap. 5.3). Wenn Ba-Ionen tatsächlich in der angedeuteten Weise in den Reaktionsmechanismus, der zur Kraftentwicklung führt, eingreifen, so war es interessant, den Einfluß von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung zu untersuchen.

Bei dieser Untersuchung wurde Wert darauf gelegt, die Ca-Aktivierungskurve in An- und Abwesenheit von $Ba^{2+}$ von ein und demselben Präparat zu erhalten, um die Ergebnisse eindeutiger quantitativ interpretieren zu können (vgl. Kap. 3.1.1). Die Experimente wurden deshalb bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt, weil Frosch-Myofibrillenbündel bei niedrigeren Temperaturen erfahrungsgemäß widerstandsfähiger sind. Die Badlösungen wurden dementsprechend zusammengestellt (s. Tab. 1 und 2). In den Experimenten zur Ermittlung der Beziehung zwischen der $Ca^{2+}$-induzierten steady-state-Spannung in Gegenwart von $Ba^{2+}$ und dem pCa (Ca/Ba-Aktivierungskurve) wurde eine freie Ba-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M gewählt. Diese $Ba^{2+}$-Konzentration, die auch in den die Aktivierung vorbereitenden Erschlaffungslösungen vorhanden war (s. Legende Abb. 11), liegt gerade unterhalb der Schwelle für die $Ba^{2+}$-abhängige Kontraktion (s. Abb. 8) und induziert deshalb keine meßbare Spannung.

In Abb. 11 sind die Ergebnisse dieser Experimente an zwei individuellen Myofibrillenbündeln dargestellt. Die offenen Symbole stellen jeweils die von einer bestimmten freien Ca-Konzentration in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ ausgelöste relative steady-state-Spannung dar, während die entsprechenden ausgefüllten Symbole die relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannung desselben Präparates in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ zeigen. Der typische steile Anstieg der relativen $Ca^{2+}$-induzierten Spannung in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ mit zunehmender $Ca^{2+}$-Konzentration

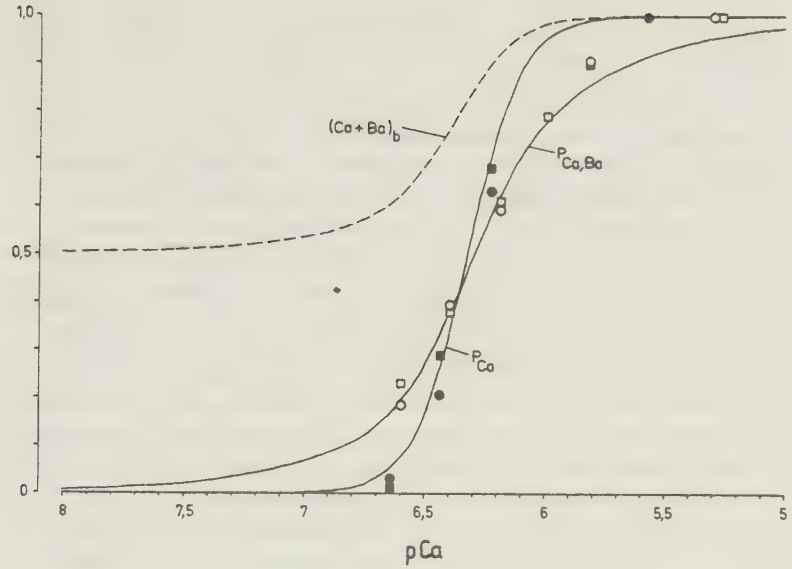



Abb. 11

Ca-Aktivierungskurven zweier individueller Myofibrillenbündel (o,●;□,■) bei 1 mM $Mg^{2+}$ in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ (●,■; $P_{Ca}$) und in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ (o,□; $P_{Ca,Ba}$).

Vor der Aktivierung in $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AC/B' (●,■) bzw. in $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen mit $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ vom Typ AC/AM/B' (o,□) wurde das Präparat jeweils für 3 min in einer Erschlaffungslösung vom Typ H/B' = 500/1 bzw. in einer Erschlaffungslösung mit $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ vom Typ H/AM = 384/1 äquilibriert. Die reine Ca-Aktivierungskurve ($P_{Ca}$), die Ca/Ba-Aktivierungskurve ($P_{Ca,Ba}$) und die Ca/Ba-Bindungskurve ($(Ca+Ba)_b$) wurden berechnet unter der Annahme, daß die Ca- und Ba-Ionen mit denselben Bindungsstellen der regulatorischen Einheit reagieren können, ein bestimmtes, heterogen mit 1 Ba- und 3 Ca-Ionen besetztes Reaktionsendprodukt jedoch keine Kraftentwicklung zur Folge hat (s. Text).
Präparate (o,●/□,■): Ø 50/50 µm, Länge 1,9/2,0 mm; Sarcomerlänge 2,7/2,7 µm.
Temp. 10 °C.

(Abb. 11, ausgefüllte Symbole; vgl. auch Abb. 8) deutet wiederum die hohe kooperative Wirkung von Ca-Ionen im Prozeß der Kraftentwicklung an , denn der Hill-Koeffizient n ist etwa gleich der für die $Ca^{2+}$-Bindung zur Verfügung stehenden Anzahl an Bindungsplätzen pro regulatorischer Einheit m ($n \approx m = 4$; vgl. KOSHLAND, 1970). In Gegenwart der unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration nimmt die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung mit steigender $Ca^{2+}$-Konzentration jedoch deutlich langsamer zu (Abb. 11, offene Symbole). Das bedeutet, daß die kooperative Wirkung von $Ca^{2+}$-Ionen bei der Spannungsentwicklung des kontraktilen Mechanismus in diesem Falle ($n \approx 2 < m$) geringer ist.

Diesen Effekt von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte Spannung, der einer Abflachung der Ca-Aktivierungskurve gleichkommt, kann man erklären, wenn zwei der 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit eine sehr hohe Affinität für Ba-Ionen besitzen. Diese Interpretation steht im Einklang mit der Erklärung für den flachen Verlauf der reinen Ba-Aktivierungskurve (s. Abb. 8; $n \approx 2 < m$) als Folge der Bindung von Ba-Ionen an alle biochemisch identifizierten $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-Komplexes (s.o. und Kap. 5.3). Mit diesem Ansatz allein ist jedoch nicht das interessante Ergebnis erklärbar, daß die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung in Gegenwart von $Ba^{2+}$ im Bereich $pCa \gtrsim 6{,}3$ größer und für $pCa \lesssim 6{,}3$ kleiner als die in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ entwickelte $Ca^{2+}$-induzierte Spannung ist (Abb. 11). Wenn nämlich aufgrund ihrer hohen Affinität für $Ba^{2+}$ ein Teil der $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Regulationsmechanismus bei einer geringen freien Ba-Konzentration bereits besetzt sind, so sollte, wenn $Ba^{2+}$ "kontraktionsfördernd" wirkt (wie die $Ba^{2+}$-Aktivierungsexperimente gezeigt haben), die von einer submaximalen freien Ca-Konzentration ausgelöste steady-state-Spannung in Gegenwart von $Ba^{2+}$ stets größer sein als in Abwesenheit von $Ba^{2+}$. Hätte die Bindung von Ba-Ionen dagegen ausschließlich einen"kontraktionshemmenden" Effekt, so würde man erwarten, daß die bei derselben überschwelligen, submaximalen $Ca^{2+}$-Konzentration entwickelte steady-state-Spannung in Gegenwart von $Ba^{2+}$ stets kleiner als in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ ist (vgl. Kap. 5.3).

Im Kap. 5.3 wird ausführlich dargestellt, daß der beobachtete sowohl fördernde als auch hemmende Effekt einer unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration auf die relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannung erklärt werden kann, wenn man annimmt, daß

(1) die kontraktile Einheit des Kontraktionsmechanismus der Skelettmuskelfaser nur dann Kraft entwickeln kann, wenn alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Untereinheit homogen mit $Ca^{2+}$ oder $Ba^{2+}$ oder heterogen mit $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ besetzt sind;

(2) eine bestimmte, vollständig und heterogen mit Ca- und Ba-Ionen besetzte regulatorische Einheit (s.u.) nicht zur Kraftentwicklung der kontraktilen Einheit führt.

Für die Spannungsentwicklung des kontraktilen Mechanismus in Gegenwart von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ seien die folgenden Bindungsreaktionen von Ca- und Ba-Ionen mit der regulatorischen Einheit (R) in einem konsekutiven Reaktionsschema (vgl. ASHLEY & MOISESCU, 1977) mit 4 separaten Reaktionsschritten von Bedeutung (vgl. MOISESCU, 1976; STEPHENSON & WILLIAMS, 1981):

(E16) $$Ca^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} CaR + Ca^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ca_2R + Ca^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ca_3R + Ca^{2+} \overset{K_4}{\rightleftharpoons} Ca_4R \propto P$$

(E17) $$Ba^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} BaR + Ba^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ba_2R + Ba^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ba_3R + Ba^{2+} \overset{K_4}{\rightleftharpoons} Ba_4R \propto P$$

(E18) $$Ba^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} BaR + Ba^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ba_2R + Ba^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ba_3R + Ca^{2+} \overset{K_{BaCa}}{\rightleftharpoons} Ba_3CaR \propto P$$

(E19) $$Ca^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} CaR + Ca^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ca_2R + Ca^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ca_3R + Ba^{2+} \overset{K_{CaBa}}{\rightleftharpoons} Ca_3BaR^*$$

Die Schemata (E16) und (E17) beschreiben die "reine" $Ca^{2+}$- bzw. $Ba^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung. Um die Spannungsentwicklung in Gegenwart beider Ionenarten zu charakterisieren, wurden zusätzlich die Reaktionsschemata (E18) und (E19) eingeführt, die die Bindung des jeweils "fremden" Ions an die regulatorische Einheit im letzten Reaktionsschritt enthalten. Die vom Kontraktionsmechanismus entwickelte steady-state-Spannung

(P) sei dann proportional zur Summe der Reaktionsprodukte $Ca_4R$, $Ba_4R$ und $Ba_3CaR$, während das heterogen besetzte Reaktionsendprodukt $Ca_3BaR^*$ nicht zur Spannungsentwicklung beiträgt. Aus dieser Modellvorstellung ergibt sich unter Berücksichtigung der Charakteristika der reinen $Ca^{2+}$- und $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung (Kap. 3.1.1) für die relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannung in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$ ($P_{Ca,Ba}$) als Funktion der freien Ca-Konzentration, $[Ca^{2+}]$, (Herleitung in Kap. 5.3):

$$(E20) \quad P_{Ca,Ba} = (A[Ca^{2+}]^4 + C[Ca^{2+}]) \cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}])^{-1}$$

Diese Gleichung beschreibt in guter Näherung die experimentellen Ergebnisse (Kurve $P_{Ca,Ba}$ in Abb. 11), wenn die Konstanten A, B und C der Gl. (E20), die apparente Affinitätskonstanten der regulatorischen Einheit für Ca-Ionen in Gegenwart von $Ba^{2+}$ darstellen, die Werte $A = 2 \cdot 10^{25}$ $M^{-4}$, $B = 5 \cdot 10^{18}$ $M^{-3}$ und $C = 7 \cdot 10^{5}$ $M^{-1}$ besitzen (s. Kap. 5.3).

Die relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ desselben Präparates wird ebenfalls in guter Näherung durch die Gl. (E20) beschrieben (Kurve $P_{Ca}$ in Abb. 11), die unter diesen Bedingungen ($[Ba^{2+}] = 0$) folgendermaßen aussieht (s. Kap. 5.3):

$$(E21) \quad P_{Ca,Ba = 0} = P_{Ca} = A[Ca^{2+}]^4 \cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4)^{-1}$$

Die theoretischen sigmoiden Kurven nach Gl. (E20) und (E21) schneiden sich bei einer freien Ca-Konzentration von ca. $4{,}37 \cdot 10^{-7}$ M (pCa 6,36), die einer relativen Spannung von ca. 43 % entspricht (Abb. 11). Für kleinere $Ca^{2+}$-Konzentrationen ist die von dem vorgestellten Modell vorausgesagte Spannung in Gegenwart von $Ba^{2+}$ größer, und für höhere $Ca^{2+}$-Konzentrationen ist sie kleiner als in Abwesenheit von $Ba^{2+}$.

Der sowohl fördernde als auch hemmende Effekt von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung wird besonders deutlich, wenn man zusammen mit der Ca/Ba-Aktivierungskurve die Ca'Ba-Bindungskurve ($(Ca+Ba)_b$ in Abb. 11) betrachtet, die der folgenden, aus dem obigen Modell abgeleiteten Funktion folgt (Her-

leitung im Kap. 5.3):

$$(E22) \quad (Ca+Ba)_b = 1 - 0{,}5 \cdot (1+A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}])^{-1}$$

Die Ca/Ba-Bindungskurve stellt die vom Regulationsmechanismus gebundene relative Menge an $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ in Abhängigkeit von pCa dar. In Gegenwart einer konstanten, unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration ($5 \cdot 10^{-5}$ M) ist bereits bei sehr geringen freien Ca-Konzentrationen (pCa > 7,5) die Hälfte aller Bindungsstellen der regulatorischen Einheiten mit Ca- oder Ba-Ionen besetzt. Bei diesen niedrigen freien Ca-Konzentrationen entwickelt sich in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ noch keine $Ca^{2+}$-induzierte Spannung (Abb. 11). In Gegenwart von $Ba^{2+}$ entsteht jedoch trotz der unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration bei diesen $Ca^{2+}$-Konzentrationen bereits Kraft, da nach der Modellvorstellung in diesem Falle das Reaktionsprodukt $Ba_3CaR$ eine Kraftentwicklung auslöst. Mit steigender $Ca^{2+}$-Konzentration bestimmen auch die Konzentrationen der Reaktionsprodukte $Ca_4R$ und $Ca_3BaR^*$ die Größe der entwickelten Spannung mit, während die Konzentration des Produktes $Ba_4R$ wegen der unterschwelligen konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration vernachlässigbar klein bleibt. Bei einem pCa von ca. 5,5 sind zwar alle Bindungsstellen des Regulationsmechanismus mit $Ca^{2+}$ oder $Ba^{2+}$ besetzt, die entwickelte Spannung ist jedoch noch submaximal (ca. 93 %), weil ein Teil der regulatorischen Einheiten in der inaktivierten Form, $Ca_3BaR^*$, vorliegen. Erst wenn bei freien Ca-Konzentrationen von $>10^{-5}$ M das $Ba^{2+}$ aus den Reaktionsprodukten $Ca_3BaR^*$ verdrängt worden ist und damit die inaktivierten regulatorischen Einheiten völlig in aktivierte ($Ca_4R$) überführt worden sind, entwickelt der kontraktile Mechanismus die maximale isometrische Spannung.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das vorgestellte relativ einfache Modell, das Bindungsreaktionen von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ mit allen $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit berücksichtigt, sowohl die in Gegenwart von $Ba^{2+}$ reduzierte kooperative Wirkung von Ca-Ionen im Prozeß der Kraftentwicklung als auch den fördernden und hemmenden Effekt von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung erklären kann.

### 3.1.5 Effekt von Cd- und Ni-Ionen auf den kontraktilen Mechanismus der enthäuteten Muskelfaser

Untersuchungen der Bindungseigenschaften der $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C mit hoher Affinität für $Ca^{2+}$ (high affinity sites; s. Kap. 1.4) mit verschiedenen Methoden haben ergeben, daß nur wenige divalente Kationen effektiv mit $Ca^{2+}$ um diese Bindungsstellen konkurrieren können (FUCHS, 1974; HARTSHORNE & BOUCHER, 1974). In der Reihenfolge ihrer Affinität für die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen sind dies $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+}$; für die Ionen $Mg^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Co^{2+}$ und $Ba^{2+}$ wurde dagegen "keine evidente Bindung" festgestellt (FUCHS, 1974). Eine ähnliche Sequenz ergab sich für die aufgeführten Ionenarten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, eine Konformationsänderung des TN-C infolge ihrer Bindung an die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Moleküls auszulösen: $Ca^{2+} \approx Cd^{2+} > Sr^{2+} \geqslant Mn^{2+} > Zn^{2+} \approx Co^{2+} \approx Ba^{2+} > Mg^{2+} \approx Ni^{2+}$ (WINTER, HEAD & PERRY, 1974). Dabei scheint die Konformationsänderung, die von Ionen mit geringer Affinität für die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen ($Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Ni^{2+}$) verursacht wird, in Art und Ausmaß verschieden zu sein von der, die durch Ionen mit hoher Affinität ($Ca^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Sr^{2+}$) ausgelöst wird. Darüber hinaus können einige der Ionen-Species, die eine hohe Affinität für TN-C haben ($Cd^{2+}$, $Sr^{2+}$), $Ca^{2+}$ auch in seiner biologischen Aktivität ersetzen, d.h. sie können die ATPase-Aktivität der Troponin-kontrollierten Actomyosin-ATPase stimulieren (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972). $Mg^{2+}$ und $Ba^{2+}$ können nach dieser Untersuchung die native Actomyosin-ATPase nicht aktivieren, während andere Autoren (TONOMURA, 1973; BERSON, 1974) jedoch eine Aktivierung dieser ATPase durch $Ba^{2+}$ feststellten (s. Kap. 1.4).

Betrachtet man die oben skizzierten Ergebnisse, so fällt auf, daß das Schwermetallion $Cd^{2+}$ in allen Untersuchungen stets in einer Gruppe mit den kontraktionsauslösenden Ionen $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ erscheint. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde vermutet, daß $Cd^{2+}$ auch den kontraktilen Mechanismus aktivieren kann (FUCHS, 1974). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Effekt von Cd-Ionen auf den kontraktilen Apparat der enthäuteten

Muskelfaser untersucht.

Für die Experimente mußten die Aktivierungslösungen in zweierlei Hinsicht geändert werden. Nach HARTSHORNE & BOUCHER (1974) besitzen die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Troponins eine Affinitätskonstante für $Cd^{2+}$ von ca. $4 \cdot 10^6\ M^{-1}$, so daß die Bindung von Cd-Ionen an die regulatorische Einheit des kontraktilen Apparates etwa in dem $Cd^{2+}$-Konzentrationsbereich $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M erfolgen sollte. In diesem Konzentrationsbereich ist EGTA wegen seiner sehr hohen Bindungskonstante für $Cd^{2+}$ (Tab. 2, Kap. 2.3.2) nicht mehr als $Cd^{2+}$-Puffer geeignet.

Der EGTA-Substituent HDTA besitzt zwar eine günstige Bindungskonstante für $Cd^{2+}$ (Tab. 2), wurde aber ebenfalls nicht als $Cd^{2+}$-Puffer eingesetzt, da es im interessanten $Cd^{2+}$-Konzentrationsbereich zu einer Ausfällung eines Cd-HDTA-Reaktionsproduktes kam. Anstelle dieser beiden Komplexone wurde das divalente Anion Succinat (Tab. 2) verwendet. Es übernimmt zusammen mit ATP in diesen physiologischen Lösungen die Funktion eines $Cd^{2+}$-Puffers, kann aber wegen seiner sehr geringen Affinität für $Ca^{2+}$ (Tab. 2) eine eventuelle Ca-Kontamination dieser Lösungen nicht wirkungsvoll unterdrücken. Deshalb wurde den zur Herstellung der eigentlichen Badlösungen verwendeten Stammlösungen das endogene $Ca^{2+}$ durch eine Passage durch eine Säule mit einem Chelator-Ionenaustauscher entzogen (s. Kap. 2.3.4).

Ein zweites Problem ergab sich bei der Verwendung des ATP-regenerierenden Systems, bestehend aus Creatinphosphat und Creatinkinase (Kap. 2.3), in den $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen. Sofort nach Zugabe von Creatinkinase (aus Kaninchenmuskel, reinst, 25 bzw. 40 U/mg; SERVA) zu den für die Experimente exakt eingestellten $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen trat eine Ausfällung auf. Mit einer Reihe von Tests konnte die Reaktion von $Cd^{2+}$ mit der Creatinkinase als Ursache für diese Präzipitation ermittelt werden. Die Zugabe von 15 U Creatinkinase/ml fertig vorbereiteter Aktivierungslösung ($\approx 7{,}5\ \mu M$) mit einer freien Cd-Konzentration $\gtrsim 3 \cdot 10^{-5}$ M führte zu einer mit bloßem Auge sichtbaren Trübung. Aufgrund dieser Proteinausfällung wurde keine Creatin-

kinase zu den $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen addiert. Creatinphosphat wurde jedoch in diesen Lösungen belassen, um (1) eine ionale Anpassung an die in den Experimenten verwendeten Erschlaffungslösungen zu gewährleisten und (2) einer in der Muskelfaser vorhandenen myofilamentären Creatinkinase (WALLIMANN, TURNER & EPPENBERGER, 1977; SAKS, ROSENSHTRAUKH, SMIRNOV & CHAZOV, 1978) ein Substrat zu liefern. Über die Wirkung von $Cd^{2+}$ auf eine derartige strukturgebundene Creatinkinase ist nichts bekannt.

In der Abb. 12 sind Spannungsentwicklungen von enthäuteten Muskelfasern in den oben charakterisierten Aktivierungslösungen mit 50 mM Succinat und ohne Creatinkinase dargestellt. Zunächst einmal ist zu erkennen, daß die EGTA-freien Lösungen vom Typ S durch die Chelator-Ionenaustauscher-Behandlung (s.o.) praktisch "von $Ca^{2+}$ befreit" worden sind, denn der kontraktile Mechanismus, der schon auf freie Ca-Konzentrationen von ca. $3 \cdot 10^{-7}$ M reagiert (Abb. 8 (Ca)), entwickelt auch bei mehrminütiger Äquilibration in dieser Lösung keine meßbare Spannung (Abb. 12b). In $Cd^{2+}$- und $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ S mit definierten freien Cd- bzw. Ca-Konzentrationen entwickeln die Präparate dagegen sehr langsam eine Spannung (Abb. 12a und c). Der langsame Verlauf der Kraftentwicklung wird durch die nur schwache Pufferung des aktivierenden Ions in Aktivierungslösungen vom Typ S und die veränderte Aktivierungsprozedur (s. Legende der Abb. 12) verursacht (vgl. Kap. 2.3). Um die Äquilibration der freien Konzentration des aktivierenden Ions im Präparatinneren etwas zu beschleunigen, wurden für diese Experimente nur sehr dünne Myofibrillenbündel ($\varnothing \leq 40$ µm) benutzt. Abb. 12d-h zeigt, daß dann die $Cd^{2+}$-induzierte Spannung deutlich schneller auf ihren steady-state-Wert ansteigt. Die Absorptions-spektrophotometrische Messung der Ca-Kontamination der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen hat ergeben, daß Badlösungen vom Typ S mit $pCd \geq 4.5$ eine unterschwellige $Ca^{2+}$-Konzentration besitzen (s. Kap. 2.3.4). Man muß deshalb die Spannungsentwicklung in $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen (Abb. 12d-f) auf eine Aktivierung des kontraktilen Mechanismus durch Cd-Ionen zurückführen. Weniger eindeutig ist die Frage zu beantworten, ob Cd-Ionen dieselbe maximale Span-

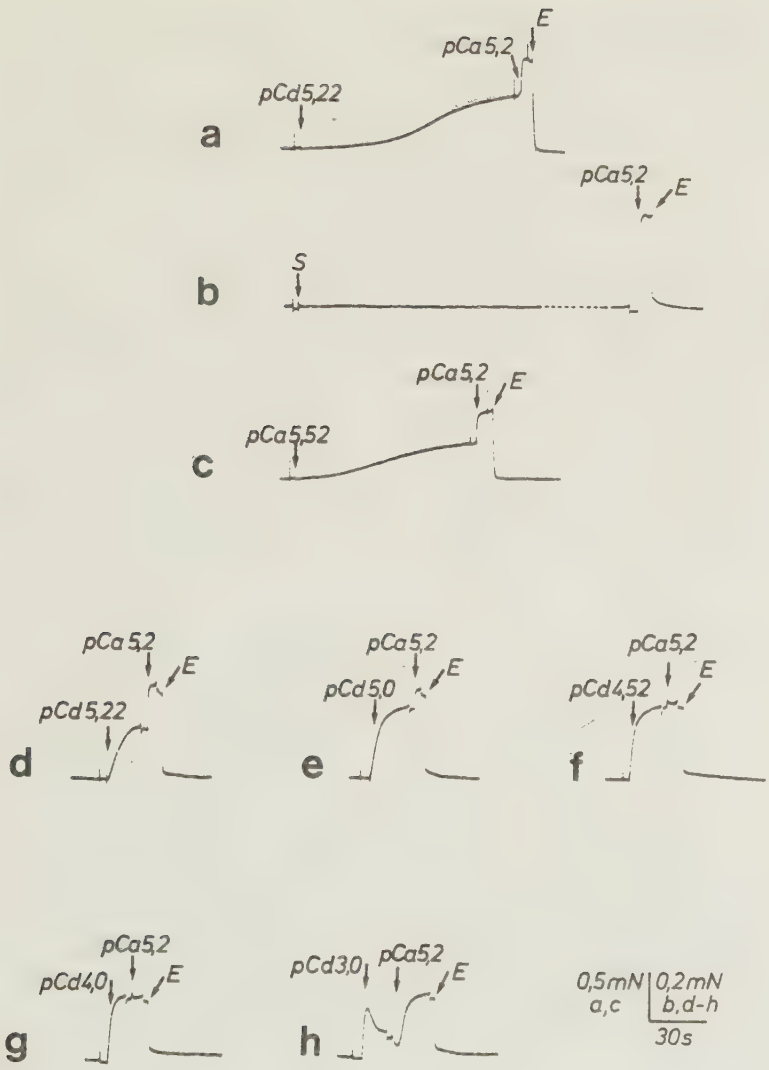



Abb. 12

Text siehe folgende Seite

Abb. 12

Spannungstransienten enthäuteter Muskelfasern in $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen (Temp. 23 °C).

(a) Spannungsentwicklung einer relativ dicken enthäuteten Muskelfaser (Ø 70 µm, Länge (L) 2,1 mm) in einer $Cd^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ S mit pCd 5,22 und anschließende maximale Aktivierung in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B mit pCa 5,2.

(b) Lange Inkubation (≈4 min) eines dünnen Myofibrillenbündels (Ø 40 µm, L 1,7 mm) in einer Erschlaffungslösung vom Typ S mit 50 mM Succinat (S) und anschließende maximale Aktivierung in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B.

(c) Spannungsentwicklung eines dünnen Präparates (Ø 50 µm, L 2,3 mm) in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung mit pCa 5,52 vom Typ S mit 50 mM Succinat und anschließende maximale Aktivierung in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B.

(d-h) Submaximale und maximale Spannungsentwicklung von dünnen Präparaten (Ø 35 µm (d-f), 40 µm (g,h); L 2,3 mm (d-f), 2,1 mm (g,h)) in $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ S mit den angegebenen pCd. Nach Erreichen der steady-state-Spannung wurde das Präparat jeweils in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B maximal aktiviert.

Vor jeder Aktivierung in Aktivierungslösungen vom Typ S wurden die Präparate zunächst für 2 min in einer Erschlaffungslösung vom Typ S mit 50 mM Succinat und 0,02 mM EGTA und anschließend für 1 min in einer Erschlaffungslösung vom Typ S mit 50 mM Succinat äquilibriert. E bezeichnet stets die Erschlaffung eines aktivierten Präparates in einer Lösung vom Typ B mit 50 mM EGTA.

nung wie $Ca^{2+}$ induzieren können. Das wird zwar in Abb. 12g angedeutet, ist aber wegen der möglichen überschwelligen $Ca^{2+}$-Kontamination dieser $Cd^{2+}$-Aktivierungslösung (Kap. 2.3.4) zunächst unsicher. Eine überschwellige $Ca^{2+}$-Konzentration der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösung würde allerdings auch bei sehr dünnen Präparaten nur einen relativ langsamen Anstieg der Spannung bewirken (vgl. Abb. 12c). Der relativ schnelle Anstieg der isometrischen Spannung auf den Maximalwert bei pCd 4,0 (Abb. 12g) scheint daher i.W. durch $Cd^{2+}$ verursacht zu werden.

In $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit einer freien Cd-Konzentration von 1 mM kam es zunächst zu einem schnellen Anstieg der Spannung auf ca. 80 % des Maximalwertes und anschließend zu einer schnellen Abnahme auf eine steady-state-Spannung von ca. 40 % der maximalen isometrischen Spannung (Abb. 12h). Bei dieser $Cd^{2+}$-Konzentration liegt ca. 84 % des insgesamt in der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösung vorhandenen ATP (8 mM) als CdATP-Komplex und ca. 14 % als MgATP-Komplex vor. Es ist bekannt, daß MgATP und CaATP beide von Actomyosin gebunden und hydrolysiert werden, jedoch nur MgATP und nicht CaATP eine Verkürzung von Myofibrillen auslösen kann (WEBER, HERZ & REISS, 1969). Nimmt man an, daß die chemische Energie des CdATP wie im Falle von CaATP von der kontraktilen Einheit nicht in mechanische Energie transformiert werden kann, so läßt sich die Abnahme der steady-state-Spannung in $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen mit $10^{-3}$ M $Cd^{2+}$ (Abb. 12h) mit einer Abnahme des Konzentrationsverhältnisses zwischen dem für die Kontraktion nutzbaren Substrat (MgATP) und dem nicht nutzbaren Substrat (CdATP) erklären. In der $Cd^{2+}$-Aktivierungslösung mit $10^{-4}$ M $Cd^{2+}$, die die maximale isometrische Spannung auslösen kann (Abb. 12g), beträgt das Verhältnis MgATP/CdATP noch 1,6/1 (4,52 mM MgATP, 2,78 mM CdATP), während es sich in der Lösung mit $10^{-3}$ M $Cd^{2+}$ um den Faktor zehn auf 1/6,2 zugunsten von CdATP ändert (1,09 mM MgATP, 6,74 mM CdATP). Der letzte Fall kann als äquivalent mit einer wirksamen Erhöhung eines kompetitiven Inhibitors der Kontraktion (CdATP) angesehen werden, der mit MgATP um die Bindungsstelle der Actomyosin-ATPase für den Metall-Nucleotid-Komplex konkurriert und hydrolysiert werden kann, ohne

dabei eine Kraftentwicklung auszulösen.

Bei der wiederholten Aktivierung einer enthäuteten Muskelfaser in $Cd^{2+}$-Aktivierungslösungen kam es eher als im Falle der $Ca^{2+}$-, $Sr^{2+}$- oder $Ba^{2+}$-Aktivierung zu einer irreversiblen Abnahme der maximalen Kontraktionskraft des Präparates. Um trotzdem eine zumindest semiquantitative Auswertung der $Cd^{2+}$-induzierten Spannungen vornehmen zu können, wurde unmittelbar nach jeder $Cd^{2+}$-Aktivierung eines Präparates eine maximale $Ca^{2+}$-Kontrollaktivierung durchgeführt (vgl. Abb. 12d-h). Die nach dem in der Legende der Abb. 13 dargestellten Kriterium ausgewerteten Spannungstransienten ergaben eine sigmoide Beziehung zwischen der relativen $Cd^{2+}$-induzierten Spannung und pCd, die durch einen Hill-Koeffizienten von n=2 charakterisiert werden kann (Abb. 13). Die Schwellenkonzentration für die $Cd^{2+}$-induzierte Kontraktion liegt bei ca. $10^{-6}$ M $Cd^{2+}$,und eine freie Cd-Konzentration von $10^{-4}$ M löst etwa eine maximale Kontraktion des kontraktilen Apparates der enthäuteten Muskelfaser aus.

In anderen Experimenten, in denen die Wirkung von $Ni^{2+}$, das extrazelluläres $Ca^{2+}$ in seiner Funktion als "Regulator" des Zeitverlaufs von $K^{+}$-Kontrakturen an der Zellmembran der intakten Muskelfaser ersetzen kann (CAPUTO, 1972), auf die an der elektro-mechanischen Kopplung beteiligten Strukturen der enthäuteten Muskelfaser (s. Kap. 1) untersucht werden sollte, wurde beobachtet, daß die enthäuteten Muskelfasern in Badlösungen mit freien Ni-Konzentrationen von $10^{-6}$ - $10^{-5}$ M eine mechanische Spannung entwickelten. Dieser Befund war überraschend, denn es ist bekannt, daß $Ni^{2+}$ $Ca^{2+}$ in einigen Vorgängen der elektro-mechanischen Kopplung auf der Ebene der Zellmembran, nicht aber in den Prozessen, die zur Kraftentwicklung des kontraktilen Apparates führen, ersetzen kann (FISCHMAN & SWAN, 1967).

In einer genaueren Untersuchung mit speziellen $Ni^{2+}$-Aktivierungslösungen (s. Kap. 2.3.1) zeigte sich jedoch, daß die in

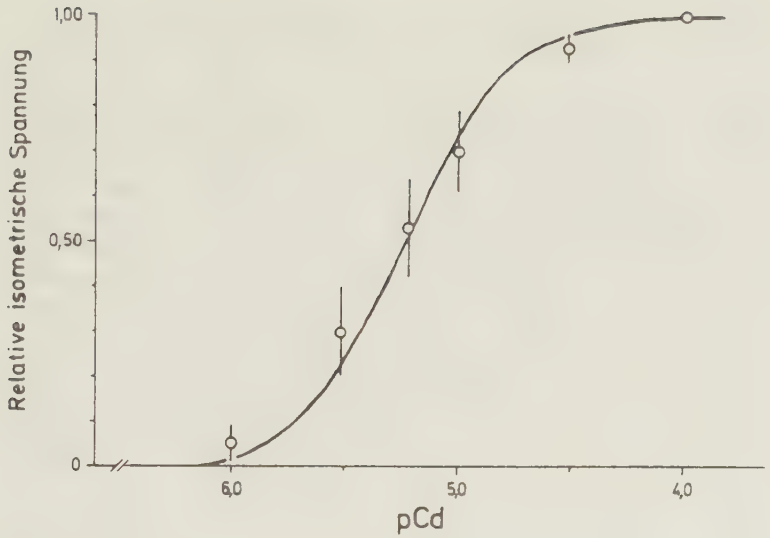



Abb. 13

Text siehe folgende Seite

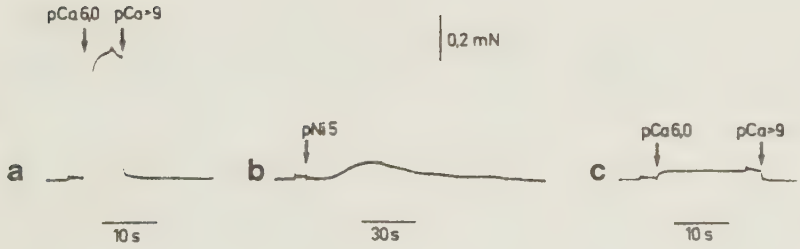



Abb. 14

Text siehe folgende Seite

Abb. 13

Cd-Aktivierungskurve von Frosch-Myofibrillenbündeln bei einer freien Mg-Konzentration von 1 mM (Temp. 23 °C).

Es sind die Mittelwerte und Streuungen von Ergebnissen aus Experimenten an 14 verschiedenen Präparaten dargestellt. Die in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ S entwickelte steady-state-Spannung wurde an einer unmittelbar anschließenden maximalen Spannungsentwicklung in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B mit pCa 5,2 normalisiert (vgl. Abb. 12d-h). Sie wurde nur dann ausgewertet, wenn die jeweilige maximale $Ca^{2+}$-Aktivierung > 85 % einer anfangs an demselben Präparat ausgelösten maximalen $Ca^{2+}$-induzierten Kontrollkontraktion ergab. Die sigmoide Kurve folgt der Funktion $P_r = K \cdot [Cd^{2+}]^n \cdot (1 + K[Cd^{2+}]^n)^{-1}$ mit den Konstanten n=2 und $K = 3 \cdot 10^{10}\ M^{-2}$.

Abb. 14

Spannungsentwicklung eines Myofibrillenbündels (Ø 30 µm; Länge 2,0 mm) in einer $Ni^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ N mit pNi 5 und pCa > 6,5 (b) und der Effekt dieser Aktivierung auf die Spannungsentwicklung in $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ AC/B mit pCa 6,0 ((a) vor, (c) nach der Inkubation in der $Ni^{2+}$-Lösung).

Vor jeder Aktivierung wurde das Präparat für 2 min in einer Erschlaffungslösung vom Typ H/B = 120/1 mit 0,4 mM EGTA (pCa > 8) äquilibriert. Alle Lösungen enthielten 237 mM $K^+$ (s. Kap. 2.3.1). Temp. 23 °C.

$Ni^{2+}$-Aktivierungslösungen auftretende Kontraktur der enthäuteten Muskelfaser spontan wieder zurückgeht (Abb.14 b) und das Präparat im Anschluß an eine "Aktivierung" mit $Ni^{2+}$ in $Ca^{2+}$-Aktivierungslösungen (Abb. 14c) nur noch höchstens etwa 10 % der vorher in diesen Lösungen ausgelösten Spannung (Abb. 14a) entwickeln kann. Diese Inaktivierung des kontraktilen Mechanismus in Lösungen mit relativ geringen $Ni^{2+}$-Konzentrationen spiegelt wahrscheinlich eine Denaturierung von Proteinen des kontraktilen Apparates wider, weil sie irreversibel war und mit einer Veränderung des Aussehens des Myofibrillenbündels einherging. Die Präparate sahen dann den glycerinierten Muskelfasern in einer Untersuchung von BOREJDO & OPLATKA (1976; Fig. 7) sehr ähnlich, die durch N-äthylmaleimid- Behandlung inaktiviert und anschließend mit wasserlöslichen, enzymatisch aktiven Myosinfragmenten und MgATP inkubiert worden waren und dabei Spannung entwickelten. Die Spannungsentwicklung in $Ni^{2+}$-Lösungen mit bemerkenswert geringen freien Ni-Konzentrationen scheint deshalb eine Folge von unphysiologischen Reaktionen von Ni-Ionen mit Elementen des kontraktilen Mechanismus zu sein, die zu einer irreversiblen Beeinträchtigung der Funktion und einer Veränderung der Struktur der enthäuteten Muskelfaser führen.

### 3.1.6 Empfindlichkeit des kontraktilen Apparates für verschiedene divalente Kationen

Verschiedene $Ca^{2+}$-modulierte Proteine enthalten eine charakteristische Konformation, die aus zwei nahezu senkrecht zueinander angeordneten Helices (E- und F-Helix) und einer diese Helices verbindenden Schleife (loop), die die eigentliche $Ca^{2+}$-Bindungsstelle des Moleküls enthält, bestehen (KRETSINGER, 1976). Zu den Proteinen, die diese als "EF-Hand" bezeichnete Konformation enthalten, gehört auch das TN-C, das aufgrund seiner Aminosäuresequenz wahrscheinlich 4 EF-Hände besitzt, die in 2 Paaren angeordnet sind und die 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des Proteins darstellen (KRETSINGER, 1976). Die Koordinationssphäre jeder Bindungsstelle für das $Ca^{2+}$-Ion wird ausschließlich von Sauerstoffatomen gebildet, die räumlich in den Ecken eines Oktaeders angeordnet sind (KRETSINGER, MOEWS, COFFEE & BRADSHAW, 1974).

Untersuchungen der Bindungseigenschaften der $Ca^{2+}$-Bindungsstelle des TN-C (vgl. Kap. 3.1.5) haben ergeben, daß diese Bindungsstelle Ionen nach ihrer Größe und Ladung selektiert (FUCHS, 1974). Dabei werden divalente Kationen von der Größe des Ca-Ions ohne seine Hydrathülle ($\approx 1$ Å) bevorzugt. Das bedeutet, daß die regulatorische Einheit des kontraktilen Mechanismus um so empfindlicher auf eine Ionenart reagiert, je besser sie an die Koordinationsgeometrie der $Ca^{2+}$-Bindungsstelle angepaßt ist (FUCHS, 1974; WINTER et al., 1974). Vergleicht man die mit $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$ und $Cd^{2+}$ ermittelten Aktivierungskurven (Abb. 8, Kap. 3.1.1 und Abb. 13, Kap. 3.1.5) miteinander, so sieht man, daß die unterschiedliche Selektivität der $Ca^{2+}$-Bindungsstelle für verschiedene Ionenarten in den unterschiedlichen Empfindlichkeiten des kontraktilen Mechanismus für diese Ionenarten zum Ausdruck kommt. Je empfindlicher der kontraktile Apparat auf eine Ionenart reagiert, desto weiter ist die Aktivierungskurve in Richtung niedrigerer Ionenkonzentrationen verschoben. So wird für das Ion $X_i^{2+}$ ($X_1^{2+} = Ca^{2+}$, $X_2^{2+} = Cd^{2+}$, $X_3^{2+} = Sr^{2+}$, $X_4^{2+} = Ba^{2+}$) eine um den Faktor $a_i(P_r)$ veränderte Konzentration als für $Ca^{2+}$ benötigt, um dieselbe relative Span-

nung ($P_r$) auszulösen:

(E23) $a_i(P_r) \cdot [Ca^{2+}]_{P_r} = [X_i^{2+}]_{P_r}$

Für $a_i(P_r)=1$ ist das kontraktile System für das Ion $X_i^{2+}$ genauso empfindlich, für $a_i(P_r)<1$ ist es empfindlicher und für $a_i(P_r)>1$ ist es unempfindlicher als für $Ca^{2+}$. Aus der Gl. (E23) ergibt sich mit Hilfe der Beziehung $-\log[X_i^{2+}]_{P_r} = pX_i(P_r)$ für den Faktor $a_i(P_r)$ die Gleichung:

(E24) $a_i(P_r) = 10^{pCa(P_r)-pX_i(P_r)}$

Entsprechend läßt sich dann die relative Empfindlichkeit des kontraktilen Mechanismus ($s_i(P_r)$) für das Ion $X_i^{2+}$ als Kehrwert des Faktors $a_i(P_r)$ definieren:

(E25) $s_i(P_r) = 1 / a_i(P_r)$

Sie ist um so größer, je größer der Wert von $s_i(P_r)$ ist. In der Tab. 3 sind die aus den Aktivierungskurven der Abb. 8 und 13 für die relativen Spannungen $P_r = 0,1$, $P_r = 0,5$ und $P_r = 0,9$ entnommenen Werte für $pX_i(P_r)$ und die daraus nach Gl. (E24) und (E25) abgeleiteten Werte für $a_i(P_r)$ und $s_i(P_r)$ zusammengestellt. Hätten alle Aktivierungskurven den gleichen Hill-Koeffizienten (n=4), so ergäben sich für jedes Ion bei allen relativen Spannungen dieselben Werte für $a_i(P_r)$ bzw. $s_i(P_r)$. Da das nicht der Fall ist, variieren diese Werte in Abhängigkeit von der betrachteten Spannung $P_r$. Vergleicht man die Werte der Rubriken II-IV der Tab. 3 zweier beliebiger Ionen miteinander, so sind fast immer alle Werte des einen Ions entweder größer oder kleiner als die des anderen. Das zeigt, daß sich die Aktivierungskurven der verschiedenen Ionenarten praktisch nicht überlappen, m.a.W., der kontraktile Mechanismus für jede der betrachteten Ionenarten in einem separaten Konzentrationsbereich empfindlich ist. Anhand der Daten aus Tab. 3 ergibt sich folgende Sequenz für die oben definierte Empfindlichkeit des kontraktilen Mechanismus für die kontraktionsauslösenden Ionen:

Tab. 3

Vergleich charakteristischer Parameter der ermittelten Aktivierungskurven von enthäuteten Frosch-Muskelfasern

| aktivierendes Ion $X_i^{2+}$ | I | II | | | III | | | IV | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | $pX_i(P_{0,1})$ | $pX_i(P_{0,5})$ | $pX_i(P_{0,9})$ | $a_i(P_{0,1})$ | $a_i(P_{0,5})$ | $a_i(P_{0,9})$ | $s_i(P_{0,1})$ | $s_i(P_{0,5})$ | $s_i(P_{0,9})$ |
| $X_1^{2+} = Ca^{2+}$ | 4 | 6,35 | 6,12 | 5,88 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $X_2^{2+} = Cd^{2+}$ | 2 | 5,72 | 5,24 | 4,75 | 4,3 | 7,6 | 13,5 | 0,23 | 0,13 | $7,4 \cdot 10^{-2}$ |
| $X_3^{2+} = Sr^{2+}$ | 4 | 4,79 | 4,56 | 4,32 | 36 | 36 | 36 | $2,8 \cdot 10^{-2}$ | $2,8 \cdot 10^{-2}$ | $2,8 \cdot 10^{-2}$ |
| $X_4^{2+} = Ba^{2+}$ | 2 | 3,65 | 3,18 | 2,69 | 500 | 870 | 1550 | $2 \cdot 10^{-3}$ | $1,1 \cdot 10^{-3}$ | $6,5 \cdot 10^{-4}$ |

I ganzzahliger Wert des Hill-Koeffizienten, der zur Beschreibung der Aktivierungskurven in Abb. 8 und 13 benutzt wurde

II $pX_i = -\log[X_i^{2+}]$, für den die relative Spannung $P_r$ = 0,1 ($P_{0,1}$), 0,5 ($P_{0,5}$) und 0,9 ($P_{0,9}$) bei einer Aktivierung mit dem Ion $X_i^{2+}$ in Abb. 8 bzw. 13 erreicht wird

III Faktor, um den die Konzentration des Ions $X_i^{2+}$ erhöht werden muß, um dieselbe Kraft wie mit $Ca^{2+}$ auszulösen

IV relative Empfindlichkeit des kontraktilen Mechanismus für das Ion $X_i^{2+}$, abgeleitet aus je 3 Punkten der entsprechenden Aktivierungskurven

$Ca^{2+} \gtrsim Cd^{2+} > Sr^{2+} \gg Ba^{2+}$.

Ähnlich wie die Aktivität der TN-kontrollierten Actomyosin-ATPase (TONOMURA, 1973) oder die Ionenbindung an TN-C (FUCHS, 1974) läßt sich die relative Empfindlichkeit des kontraktilen Mechanismus für die Ionen $Ca^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Ni^{2+}$ und $Mg^{2+}$ in Abhängigkeit von ihrem Ionenradius darstellen (Abb. 15). Im Falle von $Ni^{2+}$ wurde die beobachtete Spannungsentwicklung als unphysiologischer Prozeß, der durch eine von $Ni^{2+}$ verursachte Denaturierung von Proteinen der enthäuteten Muskelfaser ausgelöst wird (s. Kap. 3.1.5), gewertet. Von $Mg^{2+}$ ist seit langem bekannt, daß es keine Kontraktion des kontraktilen Mechanismus auslösen kann (vgl. WEBER & MURRAY, 1973). Die Kurve in Abb. 15 die durch die aus den Werten für die halbmaximalen isometrischen Spannungen resultierenden Punkte gezeichnet wurde, hat einen ähnlich spitzen Verlauf wie die Kurven für die Ionenbindung des TN-C (FUCHS, 1974) und die myofibrilläre ATPase-Aktivität (TONOMURA, 1973) mit einem Maximum bei dem Ionenradius des Ca-Ions (0,99 Å). Sie weist die Ionen $Ca^{2+}$, $Cd^{2+}$ (0,97 Å) und $Sr^{2+}$ (1,12 Å) als kontraktionsauslösende Ionen mit einer relativ hohen Affinität für den kontraktilen Mechanismus aus. Interessanterweise kann das vergleichsweise große Ba-Ion (1,34 Å), das nach FUCHS (1974) nur relativ schwach an die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C (zumindest an die high affinity sites) bindet und dessen aktivierende Wirkung auf die TN-kontrollierte myofibrilläre ATPase umstritten ist (s. Kap. 3.1.5), ebenfalls eine Kraftentwicklung des Kontraktionsmechanismus auslösen. Es besitzt zwar nur eine geringe Affinität für das kontraktile System ($s_{Ba}(P_{0,5}) \approx 1/870$), kann aber dennoch dieselbe maximale Spannung wie $Ca^{2+}$ an der enthäuteten Muskelfaser induzieren (s. Kap. 3.1.1).

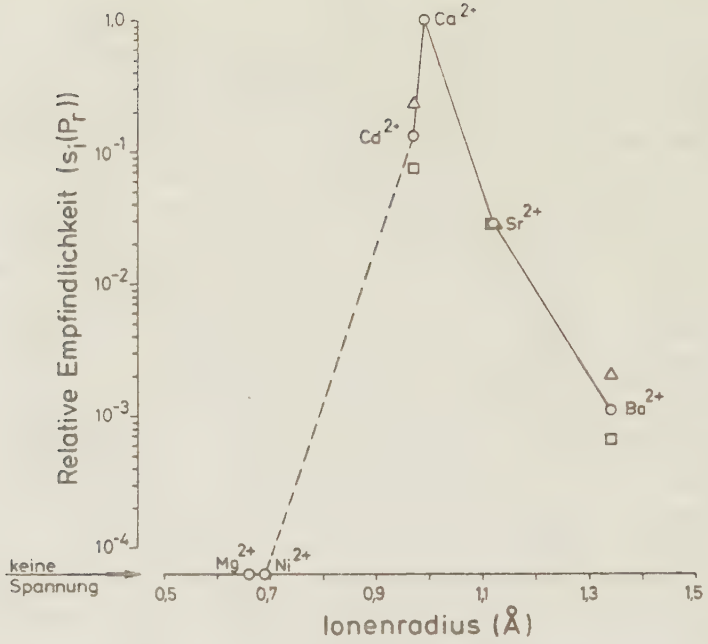



Abb. 15

Empfindlichkeit ($s_i(P_r)$) des kontraktilen Mechanismus der Froschmuskelfaser für die Ionen $Ca^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Ni^{2+}$ und $Mg^{2+}$ relativ zu seiner Empfindlichkeit für $Ca^{2+}$ in Abhängigkeit vom Ionenradius in halblogarithmischer Darstellung (Temp. 23 °C).

$s_i(P_r)$ stellt den Kehrwert des Faktors dar, um den die Konzentration des Ions $X_i^{2+}$ größer als die von $Ca^{2+}$ sein muß, um dieselbe relative Spannung $P_r$ = 0,1 (△), $P_r$ = 0,5 (○) oder $P_r$ = 0,9 (□) auszulösen (s. Text). Der Abbildung liegen die Daten aus Tab. 3 zugrunde. Ionenradien ohne Hydrathülle für die Koordinationszahl 6 (25 °C/760 Torr) aus D'ANS & LAX (1967).

## 3.2 Untersuchungen zur $Ca^{2+}$-Aufnahme und -Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser

Das Sarcoplasmatische Reticulum der enthäuteten Skelettmuskelfaser ist ein geeignetes Präparat zur Untersuchung von $Ca^{2+}$-Aufnahme- und $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozessen an diesem Kompartiment der Muskelzelle unter physiologischeren Bedingungen, als dies Vesikel-Präparationen des SR erlauben (ENDO, 1977). Die in der enthäuteten Muskelfaser weitgehend erhaltene native Struktur - insbesondere die kompakte Anordnung von kontraktilen Filamenten und SR (vgl. PEACHEY, 1965) - ermöglicht es, eine Änderung der vom kontraktilen Apparat erzeugten Spannung als Indikator für eine $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung bzw. -Nettoaufnahme ins SR zu benutzen (vgl. z.B. FORD & PODOLSKY, 1972a,b; STEPHENSON & PODOLSKY, 1977a,b). Die vom SR umgebene Myofibrille stellt sozusagen einen natürlichen, sehr empfindlichen Sensor für die freie Ca-Konzentration in der Umgebung des SR dar (ENDO & BLINKS, 1973), der eine sigmoide Kennlinie besitzt, die der Ca-Aktivierungskurve des Präparates entspricht.

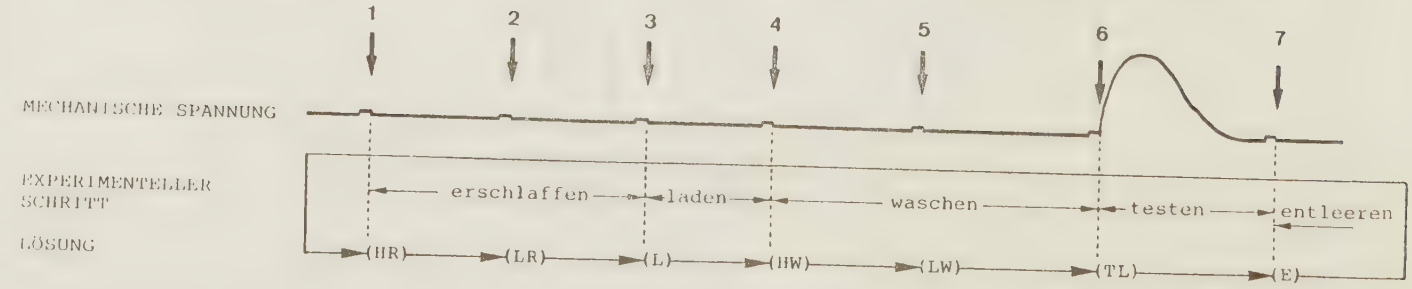
Die bei der Untersuchung des SR der enthäuteten Muskelfaser auftretenden Diffusionsprobleme sind im Prinzip von der gleichen Art wie in Aktivierungsexperimenten am kontraktilen Apparat der enthäuteten Faser (s. Kap. 2.3). Sie können durch die verwendeten Badlösungen minimalisiert werden (s. Kap. 2.3; vgl. auch MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). In den Experimenten wurde die durch einen $Ca^{2+}$-freisetzenden Stimulus auf das SR ausgelöste mechanische Spannungsentwicklung des Präparates als Meßsignal für eine $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung aus dem SR benutzt (s.o.). Um das zu erreichen, mußte der Versuchsablauf die folgenden zwei experimentellen Schritte enthalten:

(1) einen Ladungsvorgang, der eine kontrollierbare Aufnahme von Ca-Ionen ins SR ermöglicht,
(2) eine geeignete Prozedur zur $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR, die zu einer meßbaren mechanischen Spannungsentwicklung des Präparates führt.

In der Abb. 16 ist der generelle Versuchsablauf dargestellt.

Abb. 16

Genereller Versuchsablauf zur wiederholten $Ca^{2+}$-Beladung des SR und $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser




| ZEIT IN DER LÖSUNG | $t_{HR}$ (120 s) | $t_{LR}$ (60 s) | T (Ladungszeit) | $t_{HW}$ (30 s) | $t_{LW}$ (60 s) | t | $t_E$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GENERELLE ZUSAMMENSETZUNG DER LÖSUNGEN: | | | | | | | |
| pCa | >10 | >8 | definiert (6,1) | >10 | >8 | >8 | >10 |
| EGTA (mM) | 50 | 0,08 | 50 | 50 | 0,08- 2,0 | 0,08- 2,0 | 50 |
| HDTA (mM) | - | 49,92 | - | - | 48,0 -49,92 | 48,0 -49,92 | - |
| Testsubstanz(en) | - | - | - | - | - | + | - |

Die Pfeile zeigen das Eintauchen in eine neue Lösung und das Ende des vorausgegangenen experimentellen Schrittes an. Die Schritte 1-3 lassen sich als "Ladung" und die Schritte 4-6 als "Freisetzungstest" zusammenfassen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die in Klammern angegebenen Zeiten für die einzelnen experimentellen Schritte eingehalten. Alle Lösungen besaßen die im Kap. 2.3 ausgewiesene, dem physiologischen Ionenmilieu des Myoplasmas angepaßte Grundzusammensetzung.

Die Schritte 1-3 der Abb. 16 repräsentieren die Ladung des SR mit Ca-Ionen. Vor der Überführung in eine Ladungslösung (L) mit einer stark gepufferten definierten freien Ca-Konzentration wurde das Präparat in einer Erschlaffungslösung mit einer geringen $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (LR) inkubiert. Diese Ladungsprozedur gewährleistet eine schnelle und uniforme Äquilibration der $Ca^{2+}$-Konzentration der Ladungslösung an der Oberfläche des gesamten SR der enthäuteten Faser (vgl. MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Die hohe $Ca^{2+}$-Pufferkapazität der Ladungslösung (50 mM EGTA) verhindert außerdem, daß eine wesentliche Änderung der $Ca^{2+}$-Konzentration an der SR-Oberfläche infolge der $Ca^{2+}$-Aufnahme-Aktivität des SR oder einer eventuellen $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auftritt. Während der gesamten Ladungszeit ist das SR also praktisch von der konstanten freien Ca-Konzentration der Ladungslösung umgeben.

Der Ladungsvorgang wurde durch die Inkubation des Präparates für 30 sec in einer Waschlösung mit einer hohen EGTA-Konzentration (HW) beendet.Dieser Schritt, der zugleich die $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozedur einleitet (Abb. 16, 4-6), führt zu einer plötzlichen Erniedrigung der freien Ca-Konzentration im myofibrillären Raum auf $< 10^{-8}$ M. Bevor das Präparat schließlich in die Testlösung (TL)überführt wurde, die den Stimulus für das SR enthielt, wurde es für 60 sec in einer zweiten Waschlösung (LW) mit derselben Grundzusammensetzung wie die Testlösung äquilibriert. Die Testlösung enthielt zusätzlich eine oder mehrere Substanzen, deren $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung auf das SR bzw. deren Wirkung auf eine standardisierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR untersucht werden sollte. Außerdem war die $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (EGTA-Konzentration) der Testlösung gering, um

(1) eine meßbare Spannungsentwicklung des Präparates nach einem $Ca^{2+}$-freisetzenden Stimulus auf das SR zu erleichtern bzw. zu ermöglichen und
(2) lokale pH-Änderungen, die aus der Bindungsreaktion des freigesetzten $Ca^{2+}$ mit EGTA innerhalb des Präparates resultieren und die Spannungsentwicklung wesentlich beeinflussen können (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a), zu minimalisieren.

In einigen Experimenten war der Testlösung entweder eine weitere Testlösung oder eine Erschlaffungslösung (E) mit einer hohen EGTA- und Coffein-Konzentration zur vollständigen Freisetzung des gespeicherten $Ca^{2+}$ aus dem SR und zur Entfernung des freigesetzten $Ca^{2+}$ aus dem myofibrillären Raum der enthäuteten Faser (ENDO & THORENS, 1975a) nachgeschaltet (Abb. 16, Schritt 7).

Mit dem beschriebenen Versuchsablauf konnten bis zu 20 Cyclen von $Ca^{2+}$-Ladung und -Freisetzung an ein und demselben Präparat durchgeführt werden, ohne daß sich maximale Kontrollaktivierungen des kontraktilen Apparates und $Ca^{2+}$-Kontrollfreisetzungen aus dem SR um mehr als 20 % reduzierten.

In den folgenden Kapiteln 3.2.1 - 3.2.4 werden einige Eigenschaften der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser untersucht. Dabei steht die Wirkung von Coffein auf das SR und die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung, die in enge Beziehung zu dem Coffein-Wirkungsmechanismus gebracht und der eine physiologische Bedeutung bei der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in vivo zugemessen wird (vgl. Kap. 1.2.1), unter weitgehend physiologischen Bedingungen im Mittelpunkt. Die Kapitel 3.2.5 und 3.2.6 beschäftigen sich mit der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR. Es wird darin u.a. eine Methode zur Analyse des Zeitverlaufs von Coffein-induzierten Spannungstransienten vorgestellt, die quantitative Aussagen über die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR ermöglicht.

### 3.2.1 Abhängigkeit der Coffein-Wirkung auf das SR von der $Ca^{2+}$-Konzentration innerhalb und außerhalb des SR

Die Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser ist von der $Ca^{2+}$-Konzentration der Badlösung abhängig (ENDO et al., 1970; ENDO, 1975b). Bei einer konstanten Coffein-Konzentration nimmt die $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung mit steigender $Ca^{2+}$-Konzentration der Badlösung zu, und mit zunehmender Coffein-Konzentration ist eine geringere $Ca^{2+}$-Konzentration in der Badlösung für die gleiche Nettofreisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem SR nötig (ENDO, 1975b). Aus diesen mit einer indirekten Methode (es wurde jeweils das im SR verbliebene $Ca^{2+}$ bestimmt) ermittelten Ergebnissen wurde abgeleitet, daß Coffein in den Mechanismus der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (vgl. Kap. 1.2.1) eingreift und nicht über einen unabhängigen Mechanismus verfügt (ENDO, 1975b). Das bedeutet, daß Bedingungen, die die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung beeinflussen (z.B. die $Ca^{2+}$-Konzentration außerhalb und innerhalb des SR), auch die Wirkung von Coffein auf das SR in derselben Weise beeinflussen sollten.

Diese Hypothese ist mit einer direkteren Methode (Betrachtung der Spannungsentwicklung infolge einer Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR), als sie von ENDO (1975b) angewendet wurde, an der enthäuteten Muskelfaser bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration (1 mM) überprüft worden. In der Abb. 17a-d ist die Abhängigkeit der Coffein-Wirkung vom $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR dargestellt. Das Präparat wurde nach einer anfänglichen Beladung des SR mit $Ca^{2+}$ wiederholt der $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozedur unterzogen, ohne daß es zwischendurch wieder mit $Ca^{2+}$ beladen wurde (vgl. Abb. 16). Die erste $Ca^{2+}$-Freisetzung in der Testlösung mit 0,1 mM EGTA und 5 mM Coffein im Anschluß an den Ladungsschritt (3 min bei pCa 6,1) führt zu einem sofortigen Anstieg der isometrischen Spannung bis auf den maximalen steady-state-Wert (Abb. 17 a). Während der folgenden $Ca^{2+}$-Freisetzungsschritte in derselben Testlösung (Abb. 17b-d) ist die Spannungsentwicklung in charakteristischer Weise verändert. Mit abnehmender Ca-Gesamtkonzentration im SR des Präparates, d.h. mit stei-

gender Anzahl der vorausgegangenen $Ca^{2+}$-Freisetzungsschritte (falls es während der kurzzeitigen Kontrollaktivierung des kontraktilen Apparates zu einer $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR kommt, wäre sie in allen Fällen etwa gleich groß), tritt eine zunehmende "Latenzperiode" (Abb. 17(b) ≈ 17 sec; (c) ≈ 40 sec; (d) ≈ 79 sec) auf, bevor es zu einem Spannungsanstieg kommt. Der Spannungsanstieg erfolgt stets plötzlich und erreicht beim zweiten Freisetzungsschritt ca. 70 % (Abb. 17b) und beim dritten ca. 55 % (Abb. 17c) der maximalen isometrischen Spannung. Der plötzliche Anstieg der Spannung nach der Latenzperiode deutet darauf hin, daß sich die myofibrilläre freie $Ca^{2+}$-Konzentration nicht allmählich erhöht, infolge einer $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR mit einem konstanten Zeitverlauf, sondern daß sie zu einem "kritischen Zeitpunkt" beschleunigt ansteigt. Diesem Vorgang könnte eine regenerative $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR zugrunde liegen. Das Auftreten des kritischen Zustandes hängt offenbar vom $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR ab, denn es verzögert sich zunehmend mit abnehmender Ca-Gesamtkonzentration im SR (Abb. 17a-d).

Wenn das SR durch die vorausgegangenen experimentellen Schritte bereits weitgehend "entleert" worden ist, treten Spannungsoszillationen auf, deren Anstiegsphase in der Regel etwas schneller als die Rückkehrphase verläuft (Abb. 17d). Diese repetitiven Kontraktionen in Gegenwart von Coffein wurden auch von anderen Autoren an der intakten (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968) und an der enthäuteten Frosch-Skelettmuskelfaser (EBASHI et al., 1969; ENDO et al., 1970; FORD & PODOLSKY, 1972b) beobachtet. Sie werden wahrscheinlich durch wiederholte cyclische $Ca^{2+}$-Freisetzung und -Aufnahme ins SR der Muskelfaser verursacht (ENDO et al., 1970; ENDO, 1975b). Diese Interpretation beinhaltet, daß in der Coffein-haltigen Testlösung auch eine $Ca^{2+}$-Reakkumulation ins SR stattfindet. Spannungsoszillationen wurden in Testlösungen mit geringen EGTA-Konzentrationen (≲ 0,1 mM) bis hinauf zu Coffein-Konzentrationen von 20 mM beobachtet.

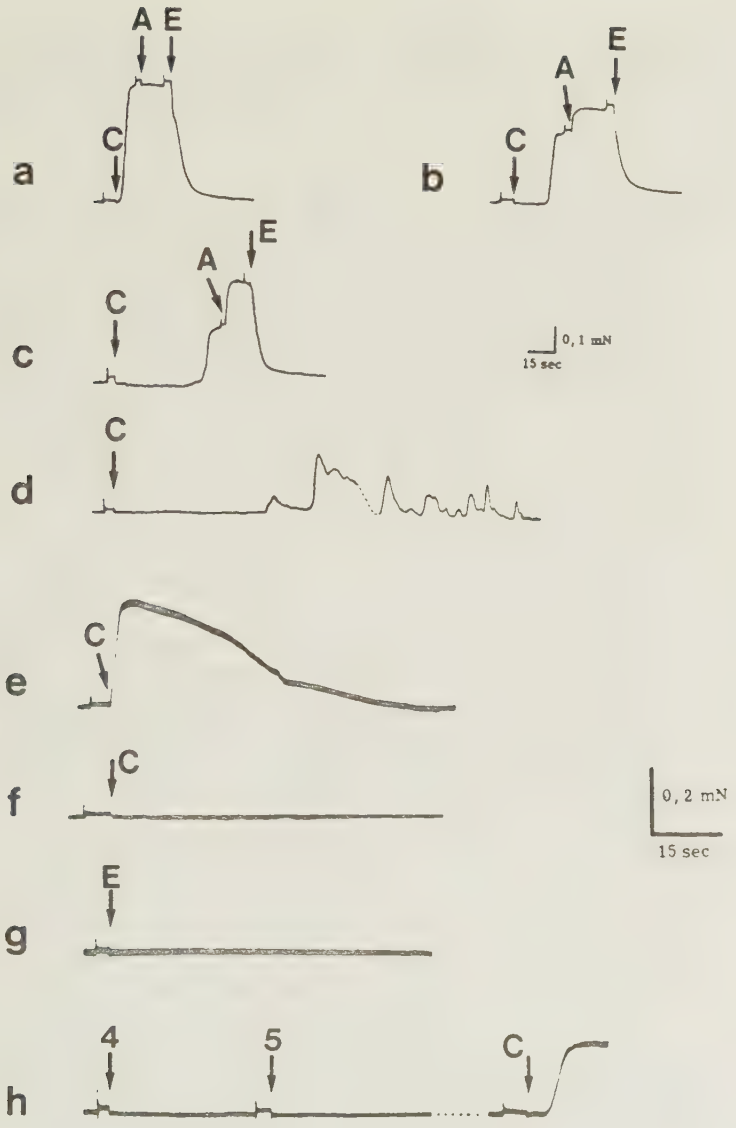



Abb. 17

Text siehe folgende Seite

Abb. 17

Abhängigkeit der Coffeinwirkung auf das SR von dem $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR (a-d) und der $Ca^{2+}$-Konzentration an der SR-Außenseite (e-h).

(a-d) Spannungsentwicklung der enthäuteten Faser (Ø 70 µm, Länge 1,9 mm) bei aufeinander folgenden $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozeduren in einer Testlösung vom Typ H/B mit 0,1 mM EGTA und 5 mM Coffein (C) ohne zwischenzeitliche Wiederbeladung des SR mit $Ca^{2+}$ (anfänglich $Ca^{2+}$-Ladung in pCa 6,1 für 3 min). (A) Maximale Kontrollaktivierung des kontraktilen Apparates mit einer Lösung vom Typ AC/B (pCa 5,2) nach Erreichen der Spannungsamplitude. (E) Erschlaffung des Präparates in einer Lösung vom Typ B mit 50 mM EGTA und 10 mM Coffein für 1 min vor Beginn eines neuen $Ca^{2+}$-Freisetzungsschrittes (vgl. Abb. 16, 4-6).

(e-h) (e) Vollständiger Spannungstransient eines Präparates (Ø 80 µm, Länge 2,1 mm) in der Testlösung C (s.o.). (f) Erneuter $Ca^{2+}$-Freisetzungsschritt in derselben Lösung ohne zwischenzeitliche $Ca^{2+}$-Beladung des SR. (g) Inkubation des wieder mit $Ca^{2+}$ beladenen Präparates (3 min bei pCa 6,1) in der Testlösung E (s.o.). (h) $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozedur im Anschluß an diese Inkubation mit den Waschschritten 4 und 5 im Schema des Versuchsablaufs (Abb. 16) und der Testlösung C.

Temperatur 23 °C.

In der Abb. 17e-h ist die Abhängigkeit der Coffein-Wirkung von der $Ca^{2+}$-Konzentration an der äußeren Oberfläche der SR-Membran dargestellt. Wird die Coffein-induzierte Spannungsentwicklung in der Testlösung mit 0,1 mM EGTA nicht, wie es in Abb. 17a-c geschehen ist, durch die Überführung des Präparates in eine Lösung mit 50 mM EGTA unterbrochen, so kehrt die Spannung nach Erreichen eines Maximalwertes allmählich wieder auf den Ruhewert zurück (Abb. 17e). Ein zweiter identischer $Ca^{2+}$-Freisetzungsschritt im Anschluß an diesen Spannungstransienten führt im Gegensatz zu der Situation nach einer unterbrochenen $Ca^{2+}$-Freisetzung (Abb. 17b) nicht mehr zu einer Spannungsentwicklung (Abb. 17f). Das bedeutet, daß das SR während des kompletten Spannungstransienten (Abb. 17e) wenn nicht vollständig, so doch so weit entleert wurde, daß eine zweite $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozedur ohne vorherige Wiederbeladung des SR mit $Ca^{2+}$ nicht mehr zu einer Spannungsentwicklung führt.Wird das SR des Präparates wieder mit $Ca^{2+}$ beladen und anschließend in eine Testlösung mit einer wesentlich höheren EGTA- und einer doppelt so hohen Coffein-Konzentration überführt, so ist ebenfalls keine Spannungsentwicklung meßbar (Abb. 17g). Das heißt natürlich nicht, daß in dieser Testlösung keine $Ca^{2+}$-Freisetzung ausgelöst worden ist, denn die $Ca^{2+}$-Pufferkapazität dieser Lösung ist 500-mal so hoch wie die der Testlösung in Abb. 17e und könnte deshalb trotz einer vergleichbaren $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR eine Spannungsentwicklung verhindern. Auf jeden Fall sollte, wenn das Präparat für die gleiche Zeitspanne wie in Abb. 17e in dieser Testlösung gehalten wird, ein anschließender $Ca^{2+}$-Freisetzungsschritt in der Testlösung mit 0,1 mM EGTA genau wie in Abb. 17f nicht zu einer Spannungsentwicklung führen. Das ist nicht der Fall, wie die Abb. 17h zeigt. Die Spannung steigt nach einer kurzen Latenzperiode schnell auf etwa 70 % der Peak-Spannung in Abb. 17e an. Man muß daraus schließen, daß die Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung aus dem SR in der Testlösung mit 50 mM EGTA trotz einer höheren Coffein-Konzentration geringer war als in der Testlösung mit 0,1 mM EGTA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Wirkung von Coffein von der freien Ca-Konzentration an der myoplasmatischen Oberfläche des SR abhängig ist. Ein

durch Coffein induzierter $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR (STEPHENSON, 1979; 1981b) würde in der Testlösung mit 50 mM EGTA nur einen weit geringeren Anstieg der lokalen freien Ca-Konzentration an der äußeren SR-Oberfläche als in der Testlösung mit 0,1 mM EGTA bewirken. Im zweiten Fall könnte die ansteigende freie Ca-Konzentration die Schwelle für die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung (ENDO, 1975b) erreichen, so daß es dann durch diesen Mechanismus zu einer wirksamen $Ca^{2+}$-Nettofreisetzung aus dem SR kommt (STEPHENSON, 1979; 1981b). In der Testlösung mit 50 mM EGTA bliebe diese sekundäre Verstärkung des Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Efflux aus.

### 3.2.2 $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration

Bei der Untersuchung der Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR (Kap. 3.2.1) ergaben sich indirekte Hinweise auf eine Beteiligung eines regenerativen $Ca^{2+}$-abhängigen Mechanismus an der $Ca^{2+}$-Freisetzung im Skelettmuskel unter physiologischen Bedingungen. Einige Verfechter der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (ENDO & THORENS, 1975a; THORENS & ENDO, 1975) schränkten jedoch ein, daß dieser Prozeß in Frosch-Skelettmuskelfasern bei einer freien Mg-Konzentration von 1 mM nur bei unphysiologisch hohen $Ca^{2+}$-Konzentrationen ($>10^{-4}$ M) auftreten kann. Nachfolgend werden einige Experimente ohne die Verwendung von Coffein vorgestellt, die direkt zeigen, daß auch eine Erhöhung der freien Ca-Konzentration in der Umgebung des SR in dem Bereich von $4 \cdot 10^{-7}$ - $10^{-6}$ M in Gegenwart einer physiologischen freien Mg-Konzentration zu einer $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR führen kann.

Abb. 18a zeigt die Spannungsentwicklung eines Präparates, dessen SR vorher nicht mit $Ca^{2+}$ beladen worden war, in einer Aktivierungslösung mit $10^{-6}$ M $Ca^{2+}$ ohne Coffein. Wird das Präparat, dessen SR in der Aktivierungslösung Ca-Ionen akkumulieren kann, nach 2 Waschschritten wieder in dieselbe Aktivierungslösung ohne Coffein gebracht (Abb. 18b), so steigt die Spannung vorübergehend über den steady-state-Wert in dieser Lösung an. Dieser "overshoot" ist dem vorübergehenden Spannungsanstieg, der bei einer Überführung dieses Präparates in eine identische Aktivierungslösung mit 1 mM Coffein auftritt, sehr ähnlich (Abb. 18b). Aus der Ähnlichkeit dieser beiden Spannungsänderungen kann geschlossen werden, daß die schnelle Erhöhung der freien Ca-Konzentration in der Umgebung des SR auf $10^{-6}$ M eine Freisetzung von Ca-Ionen aus dem mit $Ca^{2+}$ beladenen SR der enthäuteten Faser auslöst.

Ein vergleichbarer overshoot wurde auch bei der Überführung eines mit $Sr^{2+}$ beladenen Präparats in eine $Sr^{2+}$-Aktivierungslösung ohne Coffein beobachtet (Abb. 18c).

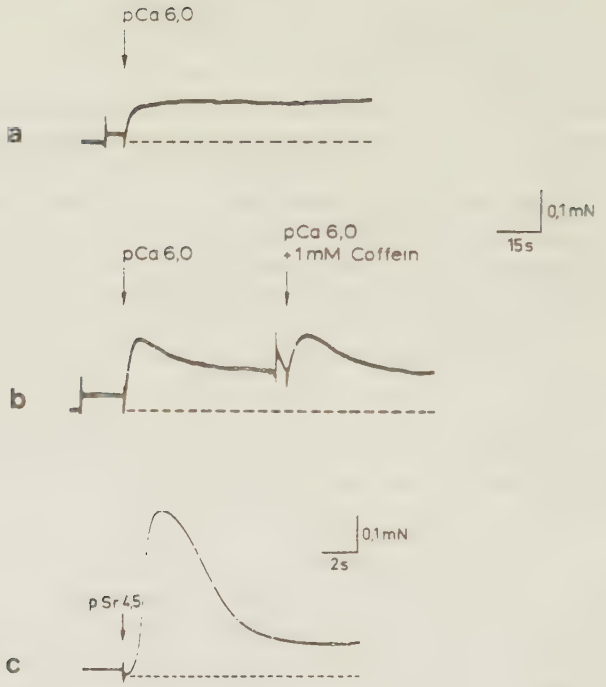



Abb. 18

$Ca^{2+}$($Sr^{2+}$)-induzierte $Ca^{2+}$($Sr^{2+}$)-Freisetzung aus dem SR in Testlösungen mit hoher EGTA-Gesamtkonzentration (50 mM) bei 1 mM $Mg^{2+}$ (Temp. 23 °C).

(a) Spannungsentwicklung eines Präparates (Ø 80 µm, Länge 1,7 mm), dessen SR vorher nicht mit $Ca^{2+}$ beladen worden war, in einer $Ca^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AC/B mit pCa 6,0.

(b) Spannungsentwicklung desselben Präparates in derselben Lösung im Anschluß an den experimentellen Schritt unter (a) und zwei weitere Waschschritte (s. Abb. 16; Schritt 4 und 5 (80 µM EGTA)). Darauf folgt ein Spannungstransient in einer identischen Lösung mit pCa 6,0 und 1 mM Coffein.

(c) Spannungstransient eines Präparates (Ø 90 µm, Länge 1,4 mm) mit einem $Sr^{2+}$-beladenen SR in einer $Sr^{2+}$-Aktivierungslösung vom Typ AS/B mit pSr 4,5 (Waschschritte wie unter (b)).

Diese $Sr^{2+}$-induzierte $Sr^{2+}$-Freisetzung aus dem SR durch eine schnelle Erhöhung der freien Sr-Konzentration an der SR-Oberfläche auf $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ M konnte an den meisten Präparaten ausgelöst und cyclisch wiederholt werden. Dagegen zeigten nur wenige Präparate eine eindeutige $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung in Badlösungen mit $10^{-6}$ M $Ca^{2+}$, wie sie in Abb. 18b dargestellt ist. Das mag andeuten, daß noch andere, bisher nicht untersuchte Faktoren, wie z.B. das Membranpotential des T-Systems (vgl. LÜTTGAU & MOISESCU, 1977), diesen Mechanismus kontrollieren.

Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß das Membranpotential des in der enthäuteten Muskelfaser verbliebenen T-Systems, dessen T-Tubuli sich nach der Enthäutung wieder verschließen können, die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR beeinflußt (NATORI, 1965; COSTANTIN & PODOLSKY, 1967). Der Einfluß dieses Membranpotentials auf die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung wurde an enthäuteten Muskelfasern von normalen und depolarisierten Muskeln untersucht. Ein Muskel wurde vor der Präparation der enthäuteten Muskelfasern in Paraffinöl für 45 min in normaler Ringerlösung bei 4 °C inkubiert. Der Zwillingsmuskel desselben Frosches wurde stattdessen isometrisch aufgespannt und für dieselbe Zeit in depolarisierender Ringerlösung mit 190 mM $K^+$ bei 4 °C gehalten (Ringerlösungen nach LÜTTGAU & SPIECKER, 1979). Die depolarisierende Ringerlösung enthielt zusätzlich $10^{-4}$ M Ouabain, um eine Repolarisation der T-Tubuli-Membran durch die aktive $Na^+$-$K^+$-Pumpe dieser Membran zu verhindern (COSTANTIN & PODOLSKY, 1967). Für die Experimente wurden Aktivierungslösungen mit freien Ca-Konzentrationen von $4 \cdot 10^{-7}$ - $10^{-6}$ M und einer EGTA-Gesamtkonzentration von nur 80 µM benutzt. In diesen Lösungen stellt sich die freie Ca-Konzentration an der Oberfläche des SR nicht so schnell ein wie in den Aktivierungslösungen mit 50 mM EGTA. Sie bieten jedoch den Vorteil, daß mit ihnen schon die Freisetzung einer geringeren $Ca^{2+}$-Menge aus dem SR direkt nachweisbar ist.

Abb. 19a-c zeigt Spannungsentwicklungen einer enthäuteten Faser, deren SR nach der Präparation zunächst nicht mit $Ca^{2+}$

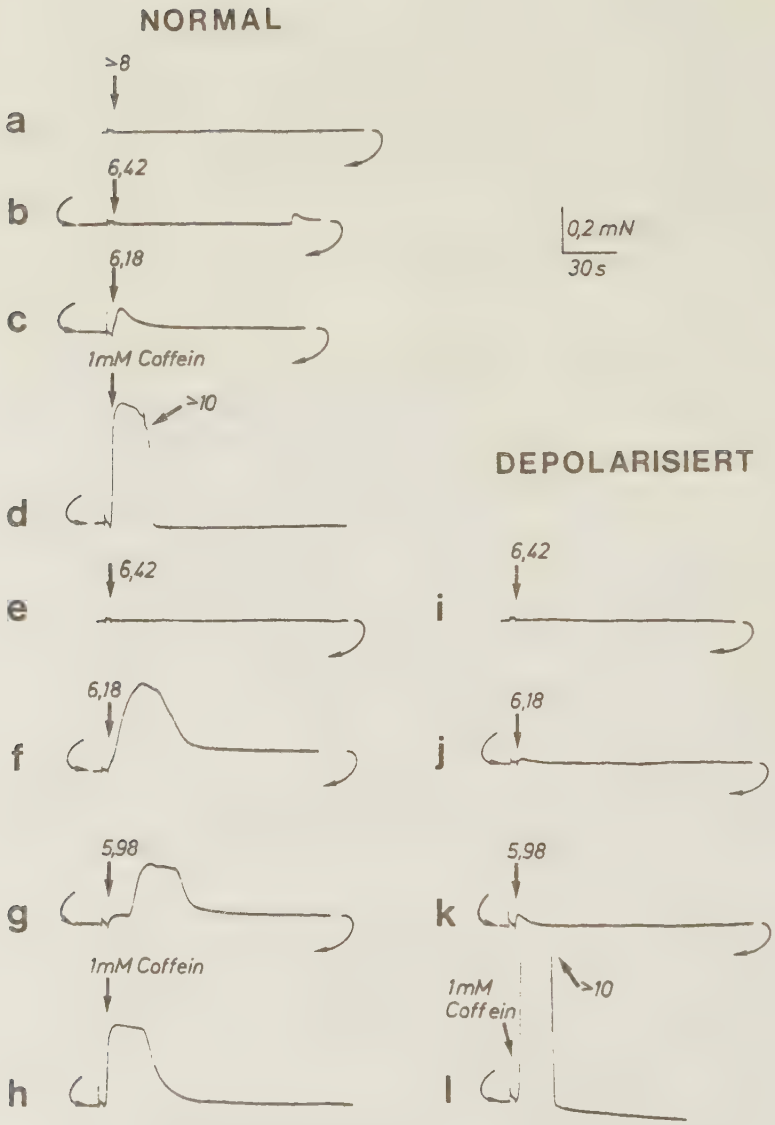



Abb. 19

Text siehe folgende Seite

Abb. 19

$Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in Testlösungen mit niedriger EGTA-Gesamtkonzentration (80 µM) bei 1 mM $Mg^{2+}$ (Temp. 23 °C).

Vor der Präparation der enthäuteten Faser wurde der Muskel für 45 min bei 4 °C entweder in Normalringer (a-h) oder in depolarisierender Ringerlösung (i-l) gehalten (s. Text).

(a-d) Überführung eines frischen Präparates (Ø 60 µm, Länge 2 mm; SR nicht in einem Ladungsschritt mit $Ca^{2+}$ beladen) nacheinander in Testlösungen mit 80 µM EGTA und pCa > 8 (a), pCa 6,42 (b), pCa 6,18 (c) und 1 mM Coffein (d; Erschlaffung in (d) in einer Lösung vom Typ B mit 50 mM EGTA).

(e-h) Überführung desselben Präparates im Anschluß an einen $Ca^{2+}$-Ladungsschritt (2 min in einer Lösung vom Typ AC/B mit pCa 6,1) und 2 Waschschritten (s. Abb. 16, Schritt 4 und 5) nacheinander in Testlösungen mit pCa 6,42-5,98 (e-g) und 1 mM Coffein (h).

(i-l) Überführung einer in derselben Weise wie unter (e)-(h) mit $Ca^{2+}$ beladenen enthäuteten Faser (Ø 60 µm, Länge 1,2 mm) eines depolarisierten Muskels nacheinander in dieselben Testlösungen wie unter (e)-(h). In der Coffeinhaltigen Lösung (h) schießt der Transient über den Meßbereich hinaus.

beladen wurden (s.o.). In der Testlösung mit pCa 6,42 kommt es nach einer langen Latenzzeit zu einer spontanen $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR (Abb. 19b). Es muß sich bei dem dabei freigesetzten Ca-Ionen nicht ausschließlich um endogen gespeichertes $Ca^{2+}$ (d.h. Ca-Ionen, die noch aus dem SR der intakten Faser stammen) handeln, denn das SR kann in der Testlösung mit pCa 6,42 Ca-Ionen aktiv aufnehmen. Bei der anschließenden Überführung in eine Testlösung mit pCa 6,18 kommt es sofort zu einer größeren vorübergehenden Spannungsentwicklung als in der Lösung mit pCa 6,42 (Abb. 19c). Diese erhöhte $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung könnte durch den größeren $Ca^{2+}$-Stimulus dieser Lösung, den mittlerweile höheren $Ca^{2+}$-Gehalt des SR (s.o.) oder durch beides verursacht werden (vgl. Kap. 3.2.1). Der große Spannungsanstieg in einer anschließenden Testlösung mit 0,08 mM EGTA und 1 mM Coffein (Abb. 19d) zeigt, daß aus dem SR in diesem Zustand durch die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung in Abwesenheit von Coffein eine geringere $Ca^{2+}$-Menge als in Gegenwart von Coffein ausgeschüttet wird. Wird das SR des Präparates in einem Ladungsschritt (2 min bei pCa 6,1) mit $Ca^{2+}$ beladen, so ändert sich die Situation (Abb. 19e,h). In denselben Testlösungen wird jetzt durch die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung ein Spannungstransient ausgelöst (Abb. 19f,g), der etwa dieselbe Höhe erreicht wie die durch Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR ausgelöste Spannungsentwicklung (Abb. 19h). Das deutet darauf hin, daß der $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR ein wichtiger Faktor für eine effektive $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration ist.

Bemerkenswerterweise konnte in den Coffein-freien Testlösungen im Anschluß an einen vollständigen Spannungstransienten durch einen erneuten $Ca^{2+}$-Stimulus wiederum eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR ausgelöst werden (Abb. 19f,g), während das in einer vergleichbaren Testlösung mit 5 mM Coffein nicht möglich war (Abb. 17e,f). Daraus läßt sich ableiten, daß in den Coffein-freien Testlösungen eine wesentlich höhere Reakkumulation von Ca-Ionen ins SR als in der Testlösung mit 5 mM Coffein statt-

fand. Eine solche effektive aktive $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR in den Coffein-freien Testlösungen wird auch durch die im Vergleich zur Testlösung mit 5 mM Coffein erheblich schnellere Rückkehrphase des Spannungstransienten angedeutet (vgl. Abb. 17e und Abb. 19f,g).

$Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzungen aus dem SR in denselben Testlösungen wie oben führen an enthäuteten Muskelfasern von depolarisierten Muskeln bei der gleichen $Ca^{2+}$-Ladungs- und -Freisetzungsprozedur zu deutlich kleineren Spannungstransienten als an normal präparierten enthäuteten Fasern (vgl. Abb. 19i-k mit Abb. 19e-g). Die Tendenz einer erhöhten $Ca^{2+}$-Freisetzung bei der Stimulierung des SR mit einer höheren freien Ca-Konzentration ist jedoch auch hier zu erkennen (Abb. 19i-k). In der Testlösung mit 1 mM Coffein kommt es zu einem schnellen, großen Spannungsanstieg,der sich praktisch nicht von dem bei einer normal präparierten enthäuteten Faser unter gleichen Bedingungen unterscheidet (Abb. 19l). Diese Ergebnisse deuten an, daß eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bei einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration

(1) auch auftritt, wenn kein Potential mehr über den Membranen der T-Tubuli der enthäuteten Muskelfaser existiert;
(2) in ihrem Ausmaß und ihrer Wirksamkeit durch ein solches, möglicherweise in der normal präparierten enthäuteten Muskelfaser vorhandenes Membranpotential begünstigt wird;
(3) sowohl durch eine Erhöhung des $Ca^{2+}$-Stimulus an der SR-Außenseite als auch des $Ca^{2+}$-Gehaltes im SR erhöht wird.

Die Wirkung von Coffein auf das SR scheint im wesentlichen von der Existenz eines Membranpotentials des rudimentären T-Systems unabhängig zu sein.

3.2.3 Der Einfluß von $SCN^-$ auf die Coffein-Wirkung auf das SR

Einige extrazellulär applizierte monovalente Anionen ($Br^-$, $NO_3^-$, $I^-$, $SCN^-$) führen an der intakten Skelettmuskelfaser zu einer Verstärkung der twitch-Kontraktion (HODGKIN & HOROWICZ, 1960b; SANDOW, 1965). Diese Anionen haben möglicherweise zwei Wirkorte an der Skelettmuskelfaser (EBASHI, 1976): einer mag mit der T-SR-Kopplung, also der elektro-mechanischen Kopplung im engeren Sinne assoziiert sein, der andere mag die SR-Membran selbst sein ("Coffein-artige" Wirkung). Aufgrund des schnellen Wirkungseintritts an der intakten Muskelfaser wurde jedoch ein intrazellulärer Wirkort ausgeschlossen (HODGKIN & HOROWICZ, 1960b). Vielmehr deuten die von $SCN^-$ verursachte Verschiebung der Kontraktionsschwelle in Richtung auf das Ruhepotential (HODGKIN & HOROWICZ, 1960b) und die Verbesserung der elektro-mechanischen Kopplung an der isolierten Einzelfaser in $Ca^{2+}$-freier Lösung durch $SCN^-$ (SPIECKER, MELZER & LÜTTGAU, 1979) auf eine Beeinflussung der Kopplung zwischen T-System-Depolarisation und $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR durch diese Anionen hin.

Für eine Untersuchung der Wirkung dieser Substanzen auf die intrazellulären, an der elektro-mechanischen Kopplung beteiligten Strukturen an der enthäuteten Muskelfaser wurde das wirksamste dieser Anionen, Thiocyanat ($SCN^-$), benutzt. Die Abb. 20 zeigt, daß $SCN^-$ selbst in einer Konzentration von 10 mM in einer Testlösung mit 80 µM EGTA weder an der frisch präparierten enthäuteten Muskelfaser - mit endogen gespeichertem $Ca^{2+}$ im SR (Abb. 20a) - noch an demselben Präparat mit einem $Ca^{2+}$-beladenen SR (Abb. 20f) eine Spannungsentwicklung auslöst. Das bedeutet, daß $SCN^-$ keine direkte, zumindest keine mit der Coffein-Wirkung vergleichbare $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung auf das SR der Skelettmuskelfaser besitzt. Wird das nicht mit $Ca^{2+}$ beladene Präparat in eine Testlösung mit 1 mM Coffein gebracht, so entwickelt sich keine Spannung (Abb. 20b). Bei der anschließenden Überführung des Präparates in eine Testlösung, die zusätzlich 1 mM $SCN^-$ enthält, tritt sofort ein großer Spannungsanstieg mit anschließenden Spannungsoszillationen auf (Abb. 20b). Die zunächst "unterschwellige" $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung

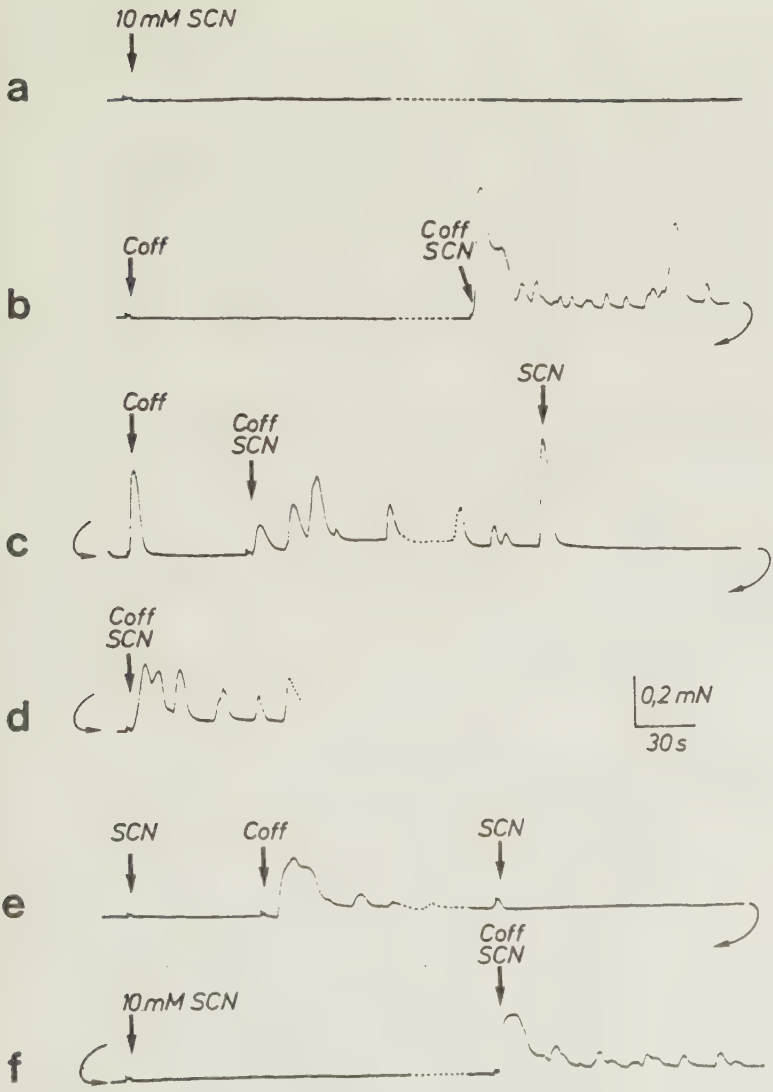



Abb. 20

Text siehe folgende Seite

Abb. 20

Einfluß von $SCN^-$ auf die Coffein-Wirkung auf das SR der enthäuteten Muskelfaser bei 0,1 mM $Mg^{2+}$ (Temp. 23 °C).

(a-d) Überführung der frisch präparierten enthäuteten Muskelfaser (Ø 80 µm, Länge 1,9 mm), deren SR nicht in einem vorausgegangenen $Ca^{2+}$-Ladungsschritt mit $Ca^{2+}$ beladen worden war, in Testlösungen mit 80 µM EGTA und entweder 10 mM $SCN^-$ (a), 1 mM Coffein (b,c; Coff), 1 mM $SCN^-$ (c; SCN) oder 1 mM Coffein und 1 mM $SCN^-$ (b,c,d; Coff, SCN).

(e-f) Überführung desselben Präparates, dessen SR in einem Ladungsschritt mit $Ca^{2+}$ beladen worden war (2 min bei pCa 6,1), in dieselben Testlösungen wie unter (a)-(d).

Die gebogenen Pfeile deuten jeweils einen fortlaufenden experimentellen Schritt an. Alle Erschlaffungs-, Ladungs-, Wasch- und Testlösungen (s. Abb. 16) enthielten eine freie Mg-Konzentration von 0,1 mM.

von Coffein auf das SR wird also offenbar in Gegenwart von Thiocyanat wesentlich verstärkt, ohne daß $SCN^-$ selbst eine $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung auf das SR ausübt. In Testlösungen, die entweder nur 1 mM Coffein oder 1 mM $SCN^-$ enthalten, verschwinden diese Spannungsoszillationen sofort (Abb. 20c). Das zeigt, daß nicht etwa eine sich bereits in der Coffein-haltigen Testlösung langsam entwickelnde $Ca^{2+}$-Freisetzung durch den Lösungswechsel "kritisch" wird (vgl. Kap. 3.2.1),sondern daß die Spannungsentwicklung tatsächlich auf der kombinierten Wirkung von Coffein und $SCN^-$ auf das SR (bzw. den T-SR-Kopplungsmechanismus) der enthäuteten Faser beruht (Abb. 20b,c,d).

Nachdem das SR des Präparates mit $Ca^{2+}$ beladen worden war, ist auch in der Testlösung,die allein Coffein enthält, eine Spannungsentwicklung mit nachfolgenden Spannungsoszillationen zu beobachten (Abb. 20e). Dies zeigt einmal mehr die Abhängigkeit der Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR vom $Ca^{2+}$-Gehalt des SR (vgl. Kap. 3.2.1).In Testlösungen mit 1 mM und 10 mM $SCN^-$ ist jedoch auch aus dem schwerer mit $Ca^{2+}$ beladenen SR keine mit dieser Methode meßbare $Ca^{2+}$-Freisetzung auszulösen (Abb. 20e,f), während in Gegenwart von Coffein und $SCN^-$ sofort wieder eine typische Spannungsentwicklung resultiert (Abb. 20f).

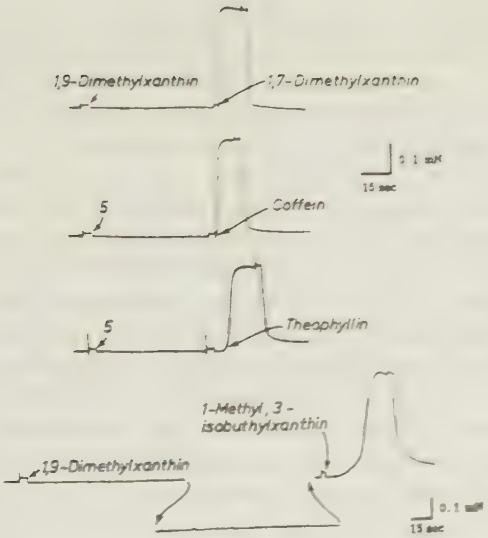
Diese Ergebnisse zeigen, daß das an der enthäuteten Muskelfaser praktisch "intrazellulär" applizierte $SCN^-$ die Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem in einem bestimmten $Ca^{2+}$-Ladungszustand befindlichen SR wesentlich verstärkt. Berücksichtigt man die aus Versuchen an der intakten Muskelfaser abgeleiteten Befunde einer primären $SCN^-$-Wirkung auf die Kopplung zwischen T-System-Depolarisation und $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR (s.o.), so läßt sich aus den vorgestellten Ergebnissen ein detaillierteres Bild für die Coffein-Wirkung auf die Skelettmuskelfaser entwickeln. Es gibt danach möglicherweise neben der bekannten, an SR-Vesikeln festgestellten direkten, vom Membranpotential des T-Systems unabhängigen Wirkung von Coffein auf die SR-Membran (vgl. ENDO, 1977) eine zweite Wirkungsweise von Coffein, die von der T-SR-Kopplung abhängig und von $SCN^-$

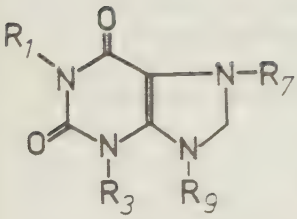
im Bereich der Füßchen-Region (vgl. Kap.1.1) beeinflußt werden kann. Der zweite Mechanismus mag mit zunehmender Annäherung des Systems an den nativen Zustand (fragmentiertes SR < enthäutete Faser < intakte Muskelfaser) eine zunehmende Bedeutung bei der Wirkung von Coffein auf den Muskel erlangen.

### 3.2.4 Die Wirkung von Coffein-ähnlichen Methylxanthinen auf das SR

Neben Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) gibt es eine Reihe strukturell ähnlicher Methylxanthine, die am Frosch-Herzmuskel eine Coffein-ähnliche Wirkung (Potenzierung der twitch-Kontraktion; Auslösung einer Kontraktur) haben (CHAPMAN & MILLER, 1974b). Sie sind jedoch nur dann effektiv, wenn der Stickstoff in der 9-Position des Purin-Grundgerüsts nicht besetzt ist, er also eine Doppelbindung besitzt (CHAPMAN & MILLER, 1974b). Aus diesen Ergebnissen wurde die Hypothese abgeleitet, daß eine Doppelbindung am Stickstoff innerhalb eines Imidazolringes für die Wirksamkeit von Methylxanthinen entscheidend ist. Da das SR der Herzmuskelzelle weniger sensitiv für Coffein ist als das der Skelettmuskelfaser (CHAPMAN & MILLER, 1974a) und sich die Wirkung von Coffein am Herzmuskel auch sonst von der am Skelettmuskel etwas unterscheidet (vgl. ENDO, 1977), war es interessant, die $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung von verschieden alkylierten Methylxanthinen auf das SR an der enthäuteten Skelettmuskelfaser direkt zu untersuchen.

Die Abb. 21 zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen am Herzmuskel, daß von den untersuchten Methylxanthinen nur diejenigen eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser auslösen können, die in der 9-Position nicht methyliert sind. 1,9-Dimethylxanthin verursacht keine meßbare $Ca^{2+}$-Freisetzung. Die verschiedenen Methylxanthine haben außerdem sehr unterschiedliche Wirkungen als Phosphodiesterase-Hemmer (BEAVO, ROGERS, CROFFORD, BAIRD, HARDMAN, SUTHERLAND & NEWMAN, 1971). Möglicherweise sind die gleichen molekularen Baumerkmale für die Wirkung dieser Substanzen einerseits als




| | $R_1$ | $R_3$ | $R_7$ | $R_9$ | $Ca^{2+}$-Freisetzung |
|---|---|---|---|---|---|
| Coffein | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | - | + |
| 1,9-Dimethylxanthin | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | - |
| 1,7-Dimethylxanthin | $CH_3$ | H | $CH_3$ | - | - |
| Theophyllin | $CH_3$ | $CH_3$ | H | - | - |
| 1-Methyl,3-isobutyl-xanthin | $CH_3$ | $C_4H_9$ | H | - | - |

Abb. 21

Vergleich der Wirkung von verschieden substituierten Methylxanthinen auf das SR (Temp. 23 °C).

Das Präparat mit einem $Ca^{2+}$-beladenen SR (2 min bei pCa 6,1) wurde jeweils im Anschluß an 2 Waschschritte (s.Abb. 16; Schritt 4 und 5) in eine Testlösung mit 0,12 mM EGTA und dem angegebenen Methylxanthin (5 mM) überführt. Unten sind die Strukturformeln der verschiedenen Methylxanthine dargestellt. Präparate: Ø 80 µm, Länge 1,9 mm (obere 3 Spuren); Ø 80 µm, Länge 1,6 mm (unterste Spur).

Kontraktionsauslöser und andererseits als Phosphodiesterase-Hemmer ausschlaggebend (CHAPMAN & MILLER, 1974b). Aufgrund dieser Parallelität wäre eine Wirkung der Methylxanthine über die Hemmung einer Phosphodiesterase und damit über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Muskelzelle möglich. In ähnlichen Experimenten wie in Abb. 21 konnte jedoch weder durch einen anderen wirksamen Phosphodiesterase-Hemmer, RO7-2956 (0,3 mg/ml), der kein Methylxanthin-Derivat ist (TSIEN, 1974), noch in Gegenwart von RO7-2956 (0,3 mg/ml) und cAMP ($10^{-5}$ M), noch durch cAMP selbst ($\leq$ 10 mM) eine Spannungsentwicklung ausgelöst werden. Auch die Coffein-induzierte Spannungsentwicklung wurde von cAMP nicht meßbar beeinflußt. Diese Ergebnisse bestätigen die Folgerungen von CHAPMAN & MILLER (1974a,b), daß die Methylxanthine direkt eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auslösen und nicht indirekt über einen cAMP-abhängigen Mechanismus wirken. Ihre Vermutung, daß cAMP aufgrund seiner molekularen Struktur (Imidazol-Rest mit Doppelbindung am N-Atom) eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auslösen könnte, ließ sich zumindest an der enthäuteten Skelettmuskelfaser nicht bestätigen.Auch Imidazol (5 mM) selbst, das am Herzmuskel etwa 20 % der Coffein-Wirkung erreichte (CHAPMAN & MILLER, 1974b), konnte in den gleichen Experimenten wie in Abb. 21 keine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Faser auslösen.

### 3.2.5 Bestimmung der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Speicherkapazität des SR über eine Analyse des Zeitverlaufs Coffein-induzierter Spannungstransienten

Der Spannungstransient einer enthäuteten Muskelfaser, der aus einer $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem vorher mit $Ca^{2+}$ beladenen SR resultiert, kann als ein Signal angesehen werden, das Informationen über die während der Ladungsperiode ins SR aufgenommene $Ca^{2+}$-Menge enthält. Eine Analyse dieses Meßsignals kann also indirekt Erkenntnisse über den Vorgang der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR der enthäuteten Muskelfaser liefern. Zur quantitativen Beschreibung von $Ca^{2+}$-Aufnahme- oder -Freisetzungsprozessen sind zwei verschiedene Parameter des Spannungstransienten benutzt worden, die Spannungsamplitude (vgl. z.B. ENDO et al., 1970; ENDO & THORENS, 1975a) und die Fläche unter dem Spannungstransienten (vgl. z.B. ENDO, 1975a;b) Am geeignetsten für eine quantitative Bestimmung der während der Ladungsphase ins SR aufgenommenen $Ca^{2+}$-Menge scheint jedoch eine quantitative Analyse des gesamten Spannungstransienten zu sein, denn die sehr empfindlichen "$Ca^{2+}$-Sensoren" in der Umgebung des SR, die Myofilamente (s. Kap. 3.2), entwickeln so lange eine Spannung, solange sie noch aus dem SR stammende Ca-Ionen "registrieren". In der vorliegenden Untersuchung wird deshalb der Zeitverlauf von Spannungstransienten, die durch Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzungen aus dem SR ausgelöst worden sind, analysiert, um quantitative Aussagen über den $Ca^{2+}$-Aufnahmeprozeß ins SR zu erhalten.

Eine Voraussetzung für die quantitative Untersuchung dieses Prozesses unter weitgehend physiologischen Bedingungen bietet die mit Hilfe der verwendeten Badlösungen und des in Abb. 16 skizzierten Versuchsablaufs mögliche wiederholte $Ca^{2+}$-Aufladung und -Freisetzung aus dem SR an ein und demselben Präparat. Der Ladungsschritt während des Versuchsablaufs (s. Abb. 16) gewährleistet, daß die freie Ca-Konzentration der Ladungslösung innerhalb von ca. 350 ms an der Oberfläche des gesamten SR des Präparates eingestellt ist. Für die gewählten Ladungszeiten (3-800 sec, s. Abb. 23) kann deshalb eine stufenartige Erhöhung

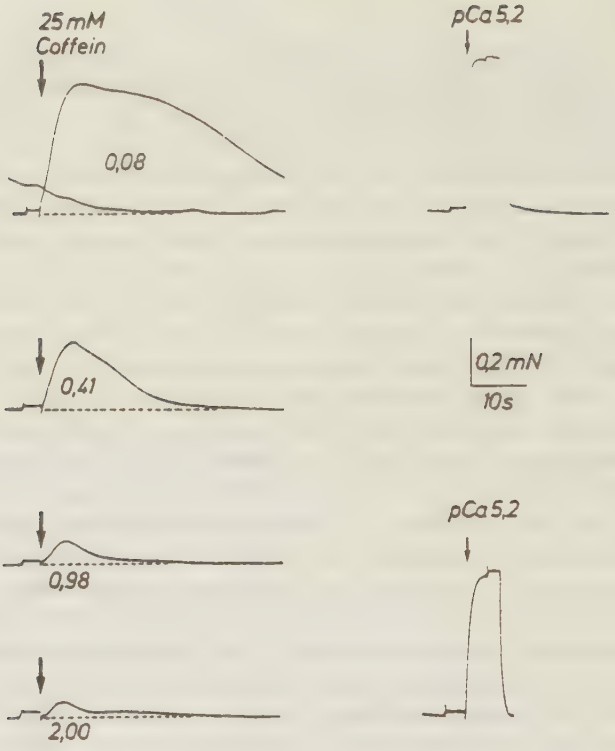



Abb. 22

Abhängigkeit der Coffein-induzierten Spannungstransienten desselben Präparates von der $Ca^{2+}$-Pufferkapazität der Testlösung.

Allen $Ca^{2+}$-Freisetzungen aus dem SR in Testlösungen vom Typ H/B' mit 25 mM Coffein (Pfeil) ging ein identischer Ladungsschritt (120 sec bei pCa 6,1) voraus. Als zweite Waschlösung (s. Abb. 16, LW) diente in allen Fällen eine Lösung vom Typ H/B' mit 0,08 mM EGTA. Unter den Spannungstransienten ist die EGTA-Konzentration der jeweiligen Testlösung in mM angegeben. Zusätzlich sind Kontrollaktivierungen des kontraktilen Apparates des Präparates mit Lösungen vom Typ AC/B' (pCa 5,2; 25 mM Coffein) im Anschluß an die erste und letzte $Ca^{2+}$-Freisetzung wiedergegeben.
Präparat: Ø 70 µm, Länge 2,1 mm. Temp. 11 °C.

der $Ca^{2+}$-Konzentration an der SR-Außenseite auf den von der Ladungslösung vorgegebenen Wert (pCa 6,1) während des Ladungsschrittes angenommen werden. Damit ist es möglich, den $Ca^{2+}$-Gehalt des SR durch eine Variation der Dauer dieser "$Ca^{2+}$-Klemme" zu variieren. Die Testlösung enthielt eine sehr hohe Konzentration an Coffein (25 mM), um das gesamte während der Ladungsphase ins SR aufgenommene $Ca^{2+}$ freizusetzen (ENDO & THORENS, 1975a). Für eine quantitative Betrachtung der resultierenden Coffein-induzierten Spannungstransienten war es erforderlich, daß die EGTA-Konzentration der Testlösung

(1) hinreichend hoch ist, damit die myofibrilläre freie Ca-Konzentration, die zu jeder Zeit die entwickelte Spannung kontrolliert, im wesentlichen durch das Verhältnis CaEGTA/EGTA bestimmt wird und daraus abgeleitet werden kann;
(2) nicht zu hoch ist, damit das freigesetzte $Ca^{2+}$ noch zu einer meßbaren Kraft führt und die Bindungsreaktion des freigesetzten $Ca^{2+}$ mit EGTA keine wesentliche pH-Änderung innerhalb des Präparates auslöst (s. Kap. 3.2).

Die Abb. 22 demonstriert, in welcher Weise die $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (EGTA-Konzentration) der Testlösung bei einer identischen Ladungsprozedur den Verlauf des Coffein-induzierten Spannungstransienten beeinflußt. Mit zunehmender EGTA-Konzentration nimmt die Amplitude und Dauer des Spannungstransienten ab. Um einerseits recht empfindlich eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR registrieren zu können, dabei aber nicht schon bei relativ kurzen Ladungszeiten in den Sättigungsbereich der Kraft zu geraten (Abb. 22; 0,08 mM EGTA), und andererseits die $Ca^{2+}$-Aufnahme über einen recht langen Zeitraum verfolgen zu können, wurden für die Experimente 2 Testlösungen mit den EGTA-Konzentrationen 0,41 und 2,0 mM gewählt (vgl. Abb. 22 und 23). Im Anschluß an eine $Ca^{2+}$-Freisetzung in einer dieser Testlösungen, wenn der Spannungstransient wieder die Ruhespannung erreicht hatte, wurde das Präparat für 1 min in einer Erschlaffungslösung vom Typ B' mit 25 mM Coffein inkubiert (vgl. Abb. 16, Schritt 7). Dadurch wurde das restliche $Ca^{2+}$ aus dem myofibrillären Raum entfernt und dieselben Ausgangsbedingungen für jeden $Ca^{2+}$-Ladungs- und -Freisetzungscyclus

eingestellt (vgl. Abb. 16).

Die mit der beschriebenen experimentellen Methode ermittelten Coffein-induzierten Spannungstransienten in Testlösungen mit 0,41 mM und 2,0 mM EGTA nach verschiedenen Zeiten der $Ca^{2+}$-Ladung des SR sind in Abb. 23 dargestellt. Zunächst einmal ist bemerkenswert, daß eine große Zahl von $Ca^{2+}$-Ladungs- und -Freisetzungscyclen an ein und demselben Präparat durchgeführt werden konnte. Dabei nahm die maximale isometrische Spannung des Präparates während der gesamten Versuchsdauer um nicht mehr als 20 % ab (Abb. 23i-k,s). Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der Transienten o und r, denen dieselbe Ladungsprozedur vorausging (T=264 s), daß die $Ca^{2+}$-Ladungs- und -Freisetzungsvorgänge sehr gut reproduzierbar sind. Die Mindest-Ladungszeit des SR, die nötig ist, um eine gerade meßbare Spannung in der Testlösung mit 2,0 mM EGTA auszulösen (Abb. 23l), ist etwa 10-mal so groß wie die, die zu einer Spannungsentwicklung in der Testlösung mit 0,41 mM EGTA führt (Abb. 23a). In beiden Arten von Testlösungen erreichen die Spannungstransienten unabhängig von der vorausgegangenen Ladungszeit innerhalb von 2-3 sec ihre maximale Amplitude. Diese Amplitudenspannung entspricht der maximalen isometrischen Spannung des Präparates in diesen Lösungen (Abb. 23 i-k,s), wenn die Ladungszeiten mehr als 33 sec im Falle von 0,41 mM EGTA in der Testlösung (Abb. 23d) und etwa 792 sec im Falle von 2,0 mM EGTA in der Testlösung (Abb. 23q) betragen. Bei längeren Ladungszeiten zeigen die Spannungstransienten eine Plateauphase, von der die Spannung nur relativ langsam mit Halbwertszeiten von ca. 6 sec auf die Ruhespannung zurückkehrt (Abb. 23e-h,q).

Ein einfacher Ansatz zur Erklärung dieses charakteristischen, langsamen Spannungsabfalls von der Plateauphase würde folgende Annahmen enthalten:

(1) Das durch 25 mM Coffein aus dem SR freigesetzte $Ca^{2+}$ verteilt sich sehr schnell und homogen in einen Zylinder mit dem Radius $r_o$, der die enthäutete Faser repräsentiert.
(2) Die freie Ca-Konzentration innerhalb dieses Zylinders, die die Spannungsentwicklung des Präparates kontrolliert, wird

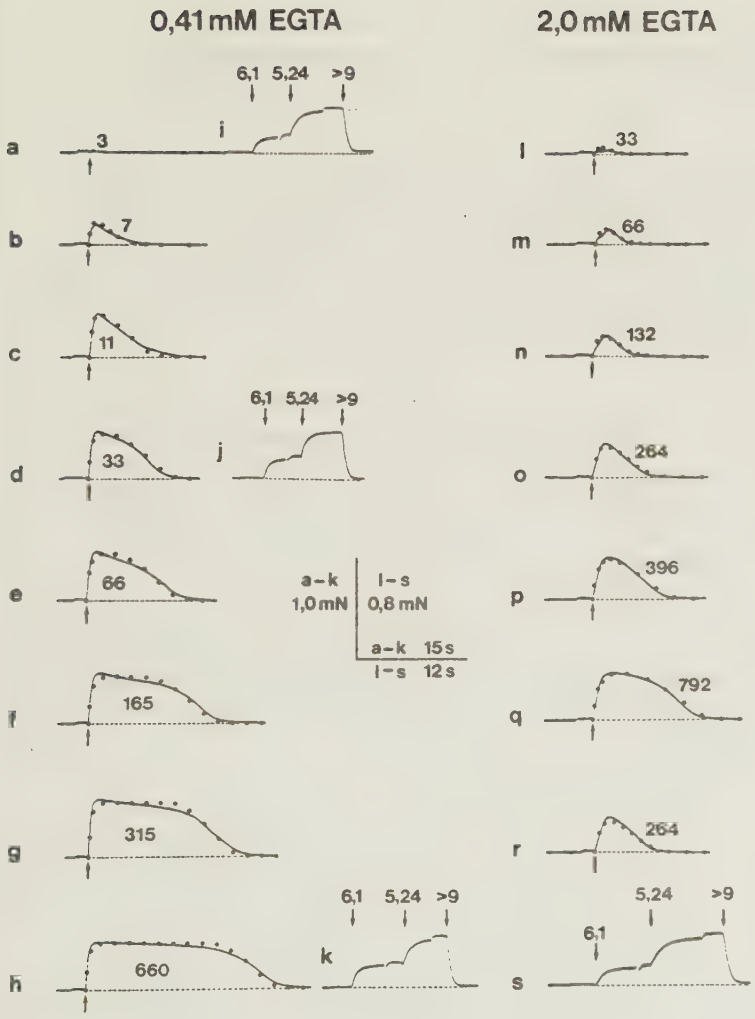



Abb. 23

Text siehe folgende Seite

Abb. 23

Durch Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR ausgelöste Spannungstransienten einer enthäuteten Muskelfaser in Testlösungen mit 0,41 mM (a-h) und 2,0 mM EGTA (l-r).

Die Zahl an jedem Spannungstransienten gibt die Dauer der vorausgegangenen $Ca^{2+}$-Ladungsperiode des SR in der Ladungslösung mit pCa 6,1 in sec an (vgl. Abb. 16). Der Pfeil unter jedem Transienten bezeichnet das Eintauchen des beladenen Präparates in die betreffende Testlösung mit 25 mM Coffein, und die gestrichelte Linie stellt die Ruhespannung des Präparates in den Erschlaffungslösungen dar.

Die Spuren i-k und s stellen Aktivierungen des kontraktilen Apparates des Präparates in Lösungen vom Typ AC/B' mit pCa 6,1 und 5,24 (maximale Kraft) und 25 mM Coffein zu verschiedenen Zeiten des Experimentes dar. Sie dienten zur Kontrolle und zur Kalibrierung der Beziehung zwischen pCa und relativer isometrischer Spannung dieses individuellen Präparates (s. Text).

Die in die Spannungstransienten eingezeichneten Punkte stellen den von dem vorgestellten Modell (I-IV) vorausgesagten Verlauf der Spannungsentwicklung nach einer vollständigen Freisetzung des im SR während der Ladungsphase gespeicherten $Ca^{2+}$ durch 25 mM Coffein dar.

Präparat: Ø 80 µm, Länge 2,5 mm. Temp. 11 °C.

im wesentlichen durch das Verhältnis CaEGTA/EGTA bestimmmt.

(3) Die freie Ca-Konzentration im Präparat ändert sich mit der Zeit entsprechend dem Zeitverlauf der Diffusion von $Ca^{2+}$ und CaEGTA aus dem Zylinder ins Bad. Dabei bleibt die $Ca^{2+}$-Konzentration an der Oberfläche des Zylinders stets vernachlässigbar klein.

Mit diesem Ansatz läßt sich die zeitliche Änderung der freien Ca-Konzentration im Präparat unter der Annahme gleicher Diffusionskonstanten für $Ca^{2+}$ und CaEGTA ($4{,}6 \cdot 10^{-6}$ $cm^2 s^{-1}$; MOISESCU & THIELECZEK, 1978a) aus der Formel für die Diffusion einer Substanz aus einem Zylinder mit des Radius $r_o$ ableiten (CRANK, 1975; Fig. 5.3). Daraus ist schließlich mit Hilfe der bekannten Beziehung zwischen der freien Ca-Konzentration und der relativen isometrischen Spannung (Abb. 8(Ca)) der Zeitverlauf der Spannungsänderung abschätzbar (Abb. 24).

Die Kurve (a) der Abb. 24 zeigt den aus dieser Betrachtung resultierenden Zeitverlauf des Spannungsabfalls von der Plateauphase des Transienten. Er unterscheidet sich in zweierlei Hinsicht deutlich von der experimentell beobachteten zeitlichen Abnahme der Spannungstransienten (Kurve c). Erstens fällt die Spannung plötzlich von ihrem Maximalwert ab, ohne die charakteristische "Schulter" zu zeigen, und zweitens erreicht sie bereits nach ca. 1 sec die Ruhespannung. Der obige Ansatz enthält die Annahme, daß sich die $Ca^{2+}$-Konzentration im Bad direkt an der Oberfläche des Präparates nach der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR nicht ändert. Diese Vorstellung ist sicher nicht realistisch, denn die Testlösung, in der sich das Präparat befindet, wird während der $Ca^{2+}$-Freisetzung nicht durchmischt. Nimmt man deshalb an, daß sich das aus dem SR freigesetzte $Ca^{2+}$ anfangs homogen in einem größeren Zylinder verteilt, der aus der enthäuteten Faser und einer sie umgebenden undurchmischten Lösungsschicht besteht (vgl. ORENTLICHER, REUBEN, GRUNDFEST & BRANDT, 1974), so ließe sich das Auftreten einer Schulter zu Beginn des Spannungsabfalls erklären (Abb. 24, Kurve b; die Ausdehnung dieser Schulter hängt von der angenommenen Dicke der Schicht ab). Dennoch würde die Spannung auch in diesem Fall viel schneller abfallen,

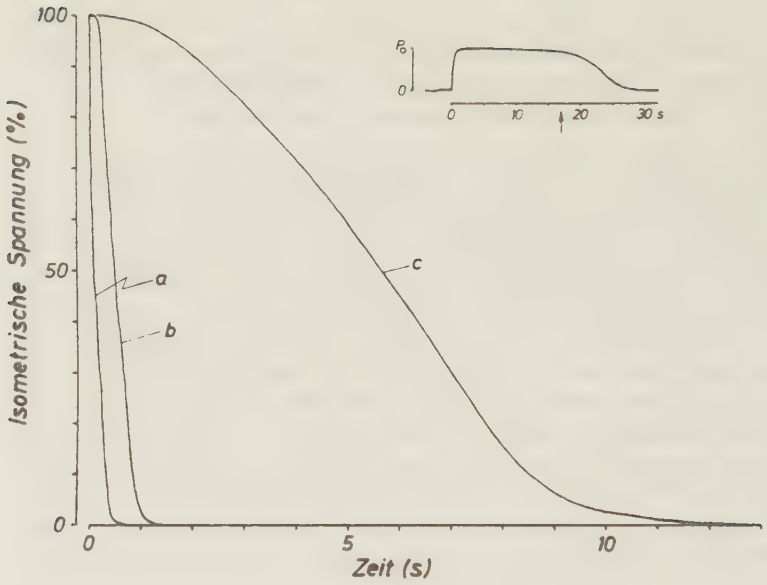



Abb. 24

Charakteristika von Coffein-induzierten Spannungstransienten.

Das Inset zeigt den im Anschluß an lange $Ca^{2+}$-Ladungszeiten des SR charakteristischen langsamen Spannungsabfall eines Coffein-induzierten Spannungstransienten von einer Plateauphase (vgl. Abb. 23). Im Diagramm ist der Zeitverlauf dieses Spannungsabfalls (c) vom Maximalwert (Pfeil im Inset) zusammen mit Spannungsabnahmen dargestellt, die erwartet werden, wenn die zeitliche Änderung der myofibrillären $Ca^{2+}$-Konzentration nach der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR durch die Diffusion von $Ca^{2+}$ und CaEGTA

(a) aus einem Zylinder, der die enthäutete Faser repräsentiert, ins Bad bestimmt wird,

(b) aus einem größeren Zylinder, der der enthäuteten Faser mit einer sie umgebenden undurchmischten Lösungsschicht von 20 µm Dicke entspricht ("Film"-Konzept; HELFFERICH, 1959), ins Bad bestimmt wird.

als es tatsächlich beobachtet wird (Kurve c). Daraus folgt, daß ein anderer, viel langsamerer Prozeß als die einfache Diffusion von $Ca^{2+}$ und CaEGTA aus dem Präparat ins Bad die zeitliche Änderung der myofibrillären freien Ca-Konzentration und damit der Kraft nach einer Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bestimmen muß.

In einer neueren Untersuchung des stimulierten $^{45}Ca$-Efflux an enthäuteten Muskelfasern ist gezeigt worden, daß der mittlere Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR mit der Zeit abnimmt. Er fällt exponentiell mit einer Geschwindigkeitskonstante in der Größenordnung von 0,06-0,1 $s^{-1}$ von einem anfänglichen Maximalwert ab (STEPHENSON, 1981b; Fig. 5). Nachfolgend wird unter den Punkten I-IV gezeigt, daß die gemessenen Coffein-induzierten Spannungstransienten (Abb. 23) in Abhängigkeit von der $Ca^{2+}$-Ladungszeit quantitativ beschrieben werden können, wenn ein derartiger, sich langsam ändernder $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR die zeitliche Änderung der myofibrillären $Ca^{2+}$-Konzentration in der enthäuteten Faser bestimmt.

(I) Coffein-induzierter $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR

Der Coffein-induzierte $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR, F(t), der mit der Geschwindigkeitskonstante $\gamma$ abnimmt, sei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der zeitlichen Änderung der myofibrillären $Ca^{2+}$-Konzentration und damit des Zeitverlaufs des resultierenden Spannungstransienten. Er kann beschrieben werden durch die Gleichung:

$$F(t) = F_o \cdot e^{-\gamma t} \qquad \text{(E26)}$$

Die Amplitude des $Ca^{2+}$-Efflux zur Zeit t=0, $F_o$, steht in Beziehung zu der aus dem SR in die Testlösung freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration (Ca(T)). Diese ist von der $Ca^{2+}$-Ladungszeit (T) des SR abhängig und ist gegeben durch:

$$Ca(T) = \int_0^\infty F(t)dt = F_o \cdot \gamma^{-1} \qquad \text{(E27)}$$

Setzt man die Gl. (E27) in die Gl. (E26) ein, so erhält man den $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR als Funktion der freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration (vgl. Abb. 25):

(E28) $$F(t) = \gamma \cdot Ca(T) \cdot e^{-\gamma t}$$

(II) Ca-Verteilung

Die quantitative Interpretation der gemessenen Spannungstransienten kann wesentlich erleichtert werden, wenn die folgenden Bedingungen zur Annäherung an die experimentelle Situation angenommen werden.

(a) Der effektive Radius, a, der enthäuteten Faser (Radius $r_o$) wird um eine Lösungsschicht der Dicke b auf der Faseroberfläche erweitert, in der keine Durchmischung mit der Badlösung eintritt (b i. allg. 10-100 µm; "Film"-Konzept, s. HELFFERICH, 1959; S. 237 ff.). Dieser Ansatz berücksichtigt die Tatsache, daß sich die Testlösung, in der sich das Präparat befindet, nicht gerührt wird und ist zur Rekonstruktion der Schulter der Spannungstransienten nötig (s.o.).

(b) Das SR der enthäuteten Faser ist homogen in dem unter (a) definierten Modellzylinder mit dem Radius $a=r_o+b$ verteilt.

(c) Die $Ca^{2+}$-Konzentration an der äußeren Oberfläche dieses Zylinders ist zu allen Zeiten praktisch gleich null.

(d) Der radiale Diffusionskoeffizient von $Ca^{2+}$ und allen anderen $Ca^{2+}$-Komplexen (hauptsächlich CaEGTA) in dem Modellzylinder ist ähnlich dem von CaEGTA im Präparat, D ($\approx 4{,}6 \cdot 10^{-6}$ $cm^2 s^{-1}$; MOISESCU & THIELECZEK, 1978a).

(e) Die Diffusions-limitierten Prozesse innerhalb des Modellzylinders sind viel schneller als der Zeitverlauf des $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR, der den Zeitverlauf der Spannungstransienten bestimmt (s.o.).

Für die durch die Punkte (a)-(e) definierte experimentelle Situation kann der Zeitverlauf der $Ca^{2+}$-Verteilung im Modellzylinder berechnet werden. Er wird durch die folgende inhomo-

gene Differentialgleichung beschrieben:

$$(E\ 29) \quad D \cdot \left(\frac{\partial^2 Ca(r,t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial Ca(r,t)}{\partial r}\right) = - F(t)$$

Die Annahme (e) besagt, daß die Verteilung des aus dem SR freigesetzten $Ca^{2+}$ im Modellzylinder, $Ca(r,t)$, zu jedem Zeitpunkt im Gleichgewicht mit dem $Ca^{2+}$-Efflux ($F(t)$) aus dem SR ist. Die Lösung der Differentialgleichung (E 29) lautet dann (vgl. CARSLAW & JAEGER, 1959; Kap. VII):

$$(E\ 30) \quad Ca(r,t) = \gamma \cdot e^{-\gamma t} \cdot (a^2 - r^2) \cdot (4D)^{-1} \cdot Ca(T)$$

$Ca(r,t)$ repräsentiert die Ca-Gesamtkonzentration zur Zeit t auf dem Umfang eines Zylinders mit dem Radius r ($0 < r < a$; s. Abb. 25).

(III) Myofibrilläre freie Ca-Konzentration

Aufgrund des relativ langsamen Zeitverlaufs der Spannungstransienten (Abb. 23) kann angenommen werden, daß die lokale Spannung im Präparat zu jeder Zeit der Plateau- und Rückkehrphase im Gleichgewicht mit der lokalen freien Ca-Konzentration im Querschnitt des Präparates steht (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Diese lokale $Ca^{2+}$-Konzentration innerhalb des Modellzylinders auf einem Umfang mit dem Radius r, $Ca^{2+}(r,t)$, wird durch die Ca-Gesamtkonzentration zur Zeit t an dieser Stelle ($Ca(r,t)$) und die EGTA-Gesamtkonzentration im Modellzylinder ($EGTA_t^i$) bestimmt. Für $EGTA_t^i$ wurde ein durchschnittlicher Wert von 1/5 der EGTA-Konzentration der Testlösung angenommen, der dem gemessenen, durch die negativ geladenen Myofilamente verursachten Donnan-Potential zwischen dem intra- und extramyofibrillären Raum (STEPHENSON, WENDT & FORREST, 1981) Rechnung trägt. Mit Hilfe von Gl. (E 30) läßt sich dann die myofibrilläre freie Ca-Konzentration auf dem Umfang mit dem Radius r zur Zeit t aus der $Ca^{2+}$-Bindung an EGTA im Modellzylinder im Gleichgewichtszustand berechnen (vgl. Kap. 2.3.1):

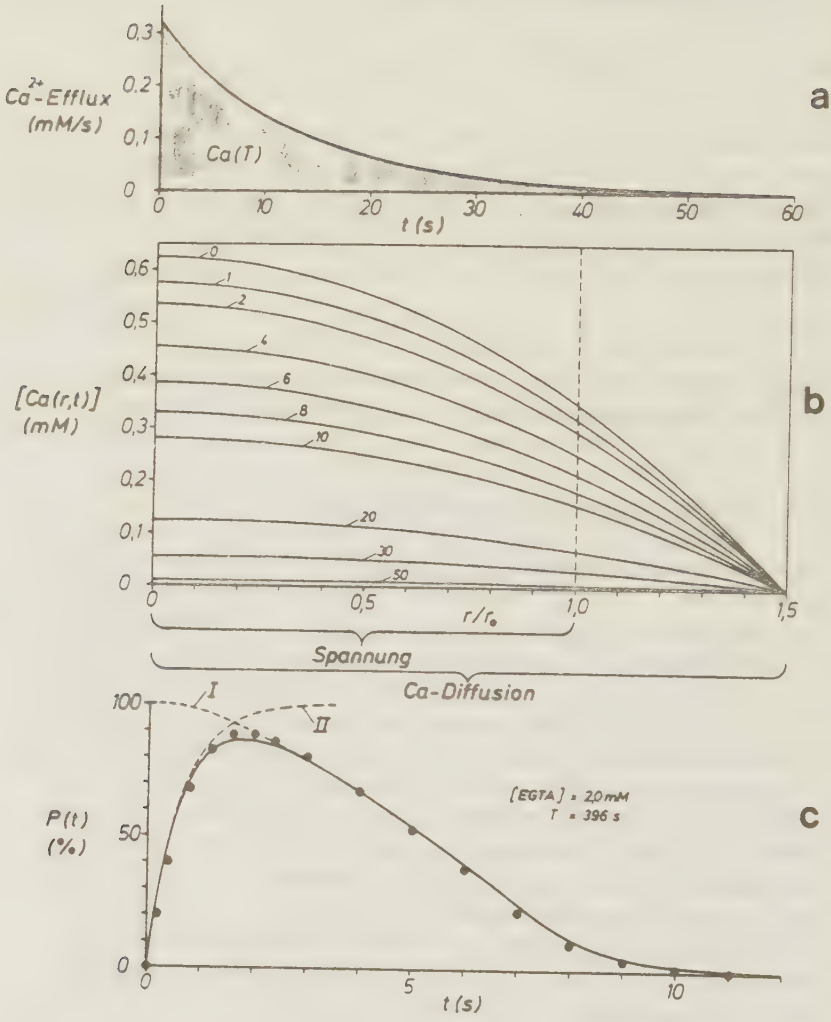



Abb. 25

Text siehe folgende Seite

Abb. 25

Coffein-induzierter $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR (a) und die nach dem vorgestellten Modell erwartete $Ca^{2+}$-Verteilung (b) und Spannungsentwicklung des Präparates (c).

Die Abbildungen sind repräsentativ für eine $Ca^{2+}$-Ladungszeit von 396 sec und eine $Ca^{2+}$-Freisetzung und Spannungsentwicklung in der Testlösung mit 2,0 mM EGTA (s. Abb. 23p).

(a) $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR mit einer Geschwindigkeitskonstante $\gamma = 0{,}08\ s^{-1}$. Die Fläche unter der Kurve stellt die in die Testlösung freigesetzte Ca-Gesamtkonzentration (Ca(T)) dar.

(b) Verteilung des durch den $Ca^{2+}$-Efflux zur Zeit t freigesetzten $Ca^{2+}$ im Querschnitt des Modellzylinders mit dem Radius r, $0 < r < a = 1{,}5\ r_o$ (Zeit t in sec an den Kurven). Zur Spannungsentwicklung tragen nur die lokalen $Ca^{2+}$-Konzentrationen innerhalb der Faser ($r = r_o = 40\ \mu m$) bei, während für die $Ca^{2+}$-Verteilung der gesamte Modellzylinder ($r = a$) zur Verfügung steht.

(c) Zeitverlauf des Spannungstransienten, der durch die vom $Ca^{2+}$-Efflux bestimmte Änderung der myofibrillären $Ca^{2+}$-Konzentration verursacht wird. P (t) stellt die vom Faserquerschnitt entwickelte durchschnittliche relative Spannung zu einer gegebenen Zeit t in der Testlösung dar. Die gestrichelte Kurve I deutet den Verlauf des Spannungstransienten an, wenn sich der kontraktile Apparat der Faser im Moment des Eintauchens in die Testlösung sofort im Gleichgewicht mit der in diesem Moment vom $Ca^{2+}$-Efflux eingestellten $Ca^{2+}$-Konzentration befinden würde (hier zufällig 100 % Spannung). Die Kurve II zeigt den erwarteten Spannungsanstieg, wenn der kontraktile Apparat mit einem exponentiellen Zeitverlauf (Geschwindigkeitskonstante $\alpha = 1{,}67\ s^{-1}$) in diesen Zustand übergeht. Die durchgezogene Kurve stellt den gemessenen Spannungstransienten dar, und die Punkte deuten den von dem im Text vorgestellten Modell (I-IV) vorausgesagten Spannungstransienten für die angegebene Ladungszeit an.

$$(E\ 31)\quad Ca^{2+}(r,t) = Ca(r,t) \cdot ((EGTA_t^i - Ca(r,t)) \cdot Kapp_{Ca}^{EGTA})^{-1}$$

(IV) Spannungsentwicklung als Funktion der myofibrillären freien Ca-Konzentration

Die lokale freie Ca-Konzentration im Präparat und mit ihr die lokale Spannungsentwicklung ändert sich mit dem Radius und der Zeit (s. Gl. (E 31)). Der Zeitverlauf der Spannungsentwicklung des gesamten Querschnittes der enthäuteten Faser läßt sich dadurch annähern, daß man den Faserquerschnitt in eine Anzahl (Z) Sektoren (Kreisringe) gleicher Breite einteilt und die freie Ca-Konzentration in der Mitte jedes Sektors z (z=1,.....,Z), d.h. im Abstand $r=r_o/(2Z) \cdot (2z-1)$ von der Faser-Mitte, als repräsentativ für den gesamten betreffenden Sektor ansieht. Diese $Ca^{2+}$-Konzentration ist durch die Gl. (E 31) gegeben, die folgendermaßen umgestellt werden kann:

$$(E\ 32)\quad Ca^{2+}(r,t)_z = (Ca(r,t)/EGTA_t^i) \cdot ((1-Ca(r,t)/EGTA_t^i) \cdot Kapp_{Ca}^{EGTA})^{-1}$$

$$= \beta \cdot ((1-\beta) \cdot Kapp_{Ca}^{EGTA})^{-1}$$

Bei dieser Schreibweise erkennt man, daß die freie Ca-Konzentration des Sektors z, $Ca^{2+}(r,t)_z$, zu jeder Zeit durch die Größe des Quotienten $\beta=Ca(r,t)/EGTA_t^i$ bestimmt wird. Solange $Ca(r,t) \geq EGTA_t^i$ ist, ist die vom Sektor z entwickelte relative isometrische Spannung, $P_z(t)$, gleich 1, d.h. die Werte des Quotienten $\beta$ würden zu freien Ca-Konzentrationen führen, die eine maximale Spannung in dem entsprechenden Sektor auslösen (Gl. (E 33)). Wird die Ca-Gesamtkonzentration des Sektors kleiner als die dort vorliegende EGTA-Gesamtkonzentration ($Ca(r,t) < EGTA_t^i$), so ergeben sich freie Ca-Konzentrationen, die submaximalen Spannungen entsprechen. In diesem Fall ist die von dem Sektor z entwickelte relative steady-state-Spannung durch die Gl. (E 34) gegeben, die die Beziehung zwischen der freien Ca-Konzentration und der relativen isometrischen Spannung ausdrückt (Ca-Aktivierungskurve, s. Kap. 3.1.1):

$$(E\ 33)\quad \beta \geq 1 : P_z(t) = 1$$

(E 34) $\beta<1 : P_z(t) = K \cdot (Ca^{2+}(r,t)_z)^4 \cdot (1+K\cdot(Ca^{2+}(r,t)_z)^4)^{-1}$

Die Konstante K ($2{,}19\cdot10^{24}$ $M^{-4}$), die den kontraktilen Apparat des individuellen Präparates charakterisiert, wurde aus der mittleren relativen isometrischen Spannung ($\bar{P}$) mehrerer submaximaler Kontrollaktivierungen mit $[Ca^{2+}] = 10^{-6,1}$ M (s. Abb. 23 i-k,s) nach der Gleichung, die die Ca-Aktivierungskurve beschreibt, berechnet (s. Kap. 3.1.1):

(E 35) $K = \bar{P} \cdot (1-\bar{P})^{-1} \cdot [Ca^{2+}]^{-4}$

Setzt man die Gl. (E 35) in die Gl. (E 34) ein, so folgt für die Spannungsentwicklung des Sektors z in Abhängigkeit von der Zeit und der Ca-Gesamtkonzentration in diesem Sektor:

(E 36) $P_z(t) = K \cdot (Kapp_{Ca}^{EGTA})^{-4} \cdot (\beta/(1-\beta))^4 \cdot (1+K\cdot(Kapp_{Ca}^{EGTA})^{-4}\cdot(\beta/(1-\beta))^4)^{-1}$

Die durchschnittliche Spannungsentwicklung des gesamten Faserquerschnittes, der in Z=10 Sektoren eingeteilt wurde, zur Zeit $t_1(\bar{P}(t))$, ist dann bei einer homogenen Verteilung der Myofilamente im Querschnitt durch die Summe der steady-state-Spannungen der einzelnen Sektoren zu derselben Zeit gegeben:

(E 37) $$\bar{P}(t) = \sum_{z=1}^{10} P_z(t) \cdot ((z\cdot r_o/10)^2 - ((z-1)\cdot r_o/10)^2)$$
$$= 0{,}01 \cdot \sum_{z=1}^{10} (2z-1) \cdot P_z(t)$$

Diese Gleichung beschreibt den Zeitverlauf der Plateau- und Rückkehrphase der Coffein-induzierten Spannungstransienten. Zur Annäherung der beobachteten Anstiegsphase der Transienten wurde angenommen, daß sich die Spannung des kontraktilen Apparates des Präparates mit einem exponentiellen Zeitverlauf (Geschwindigkeitskonstante $\alpha$) auf die der myofibrillären freien Ca-Konzentration zur Zeit $t=t_o=0$ entsprechende Spannung, $\bar{P}(t_o)$, einstellt. Der Zeitverlauf des gesamten Coffein-induzierten Spannungstransienten, P(t), ist dann gegeben durch:

(E 38) $$P(t) = \bar{P}(t) - \bar{P}(t_o) \cdot e^{-\alpha t}$$

Diese Gleichung wurde zur Beschreibung des Zeitverlaufs der experimentell ermittelten Spannungstransienten in Abhängigkeit von der während der Ladungsphase ins SR aufgenommenen und anschließend in der Testlösung freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration, Ca(T), benutzt (Abb. 23).

Der Zeitverlauf eines einzelnen Spannungstransienten konnte gut angenähert werden, wenn die Geschwindigkeitskonstante des Spannungsanstiegs den Wert $\alpha = 1{,}67\ s^{-1}$ (2,0 mM EGTA) bzw. $\alpha = 2{,}33\ s^{-1}$ (0,41 mM EGTA) besaß, der $Ca^{2+}$-Efflux die Geschwindigkeitskonstante $\gamma = 0{,}08\ s^{-1}$ hatte und für den Modellzylinder eine undurchmischte Lösungsschicht mit der Dicke $b = 0{,}5\ r_o$ = 20 µm angenommen wurde (s. Abb. 25). Mit Hilfe dieser Konstanten konnten alle übrigen, an demselben Präparat mit den beiden $Ca^{2+}$-Freisetzungsprozeduren ermittelten Spannungstransienten beschrieben werden (Abb. 23), indem allein die im Anschluß an den $Ca^{2+}$-Ladungsvorgang in die Testlösung freigesetzte Ca-Gesamtkonzentration (Ca(T)) variiert und in die entsprechenden Gleichungen eingesetzt wurde.

Mit dem gleichen, durch die Punkte I-IV charakterisierten Modell konnten auch Spannungstransienten beschrieben werden, die aus Coffein-induzierten $Sr^{2+}$-Freisetzungen aus dem während der Ladungsphase mit Sr-Ionen beladenen SR in einer Testlösung mit 0,41 mM EGTA resultierten (Abb. 26). Die Analyse der von der Coffein-induzierten $Sr^{2+}$-Freisetzung ausgelösten Transienten ergab für den $Sr^{2+}$-Efflux aus dem SR eine um den Faktor 2,67 kleinere Geschwindigkeitskonstante als für den $Ca^{2+}$-Efflux (s. Legende der Abb. 26).

Trägt man die in die Testlösung freigesetzten Gesamtkonzentrationen an $Ca^{2+}$ oder $Sr^{2+}$, C(T), die die besten Annäherungen an die gemessenen Spannungstransienten ergaben, in Abhängigkeit von der Ladungszeit auf, so ergibt sich ein biphasischer Zeitverlauf (Abb. 27a). Diese Beziehung, die gleichzeitig die $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR während der Ladungsperiode reflek-

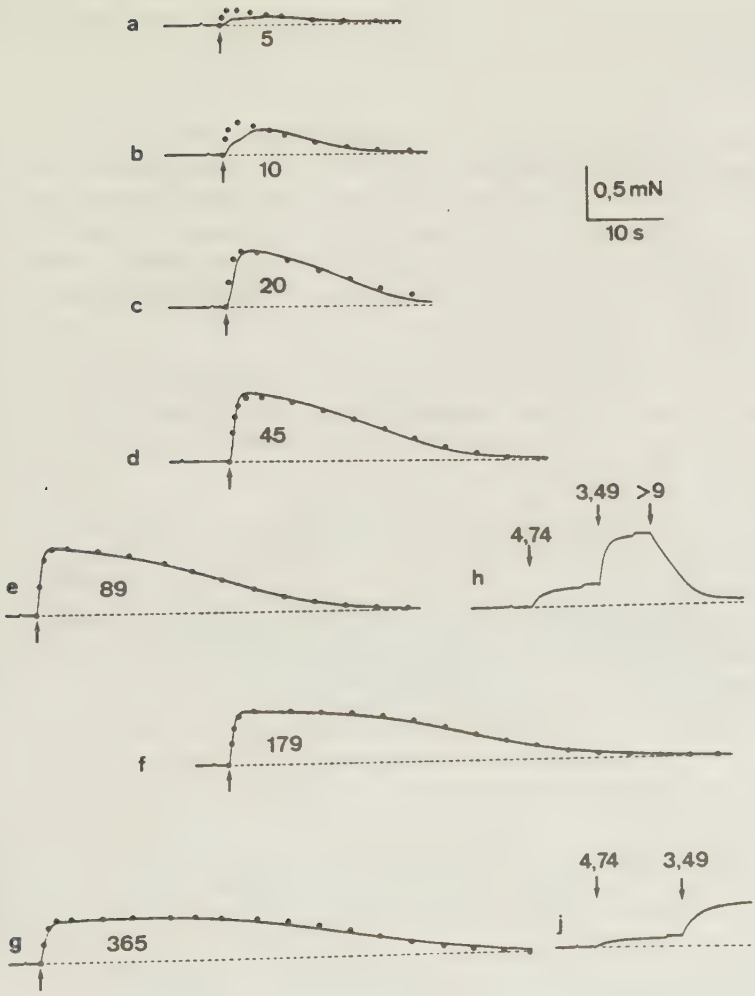



Abb. 26

Text siehe folgende Seite

Abb. 26

Durch Coffein-induzierte $Sr^{2+}$-Freisetzung aus dem SR ausgelöste Spannungstransienten einer enthäuteten Muskelfaser in einer Testlösung mit 0,41 mM EGTA (a-g).

Die Zahl an jedem Spannungstransienten gibt die Dauer der vorausgegangenen Ladungsperiode des SR in einer Ladungslösung mit pSr 4,74 in sec an (vgl. Abb. 16). Die Pfeile unter den Transienten bezeichnen das Eintauchen des $Sr^{2+}$-beladenen Präparates in die Testlösung mit 25 mM Coffein, und die gestrichelte Linie stellt die Ruhespannung des Präparates in den Erschlaffungslösungen dar.

Die Spuren h und j geben Aktivierungen des kontraktilen Apparates des Präparates in Lösungen vom Typ AS/B' mit pSr 4,74 und 3,49 (maximale Kraft) und 25 mM Coffein zu verschiedenen Zeiten des Experimentes wieder (vgl. Abb. 23).

Die in die Spannungstransienten eingezeichneten Punkte stellen den nach dem vorgestellten Modell (I-IV) mit den Konstanten $\alpha = 1{,}67\ s^{-1}$, $\gamma = 0{,}03\ s^{-1}$, $b = 0{,}5 \cdot r_o$ und $K = 2{,}77 \cdot 10^{18}\ M^{-4}$ berechneten Verlauf der Spannungsentwicklung nach einer vollständigen Freisetzung des während der Ladungsperiode ins SR aufgenommenen $Sr^{2+}$ durch 25 mM Coffein dar (s. Text).
Präparat: Ø 95 µm, Länge 1,6 mm. Temp. 11 °C.

tiert, kann durch eine Summe von 2 exponentiellen Funktionen beschrieben werden:

(E 39) $$C(T) = A_1 \cdot (1-e^{-a_1 T}) + A_2 \cdot (1-e^{-a_2 T})$$

Darin repräsentiert $a_1$ die Geschwindigkeitskonstante eines relativ schnellen $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Aufnahmeprozesses während der Ladungszeit T, der zu einer freisetzbaren Ca- bzw. Sr-Gesamtkonzentration $A_1$ führt. Der zweite, langsame Prozeß wird durch die entsprechenden Größen $a_2$ und $A_2$ charakterisiert. Basierend auf den Ergebnissen in der Testlösung mit 0,41 mM EGTA (Abb. 27d) wurden für den schnellen Prozeß im Falle von $Ca^{2+}$ die Werte $a_1 = 0{,}21\ s^{-1}$ und $A_1 = 0{,}8$ mM und im Falle von $Sr^{2+}$ die Werte $a_1 = 0{,}14\ s^{-1}$ und $A_1 = 0{,}55$ mM ermittelt (Abb. 27c,d). In der Testlösung mit 2,0 mM EGTA ist die schnelle Komponente der $Ca^{2+}$-Aufnahme nicht feststellbar, weil nach Ladungszeiten von $\gtrsim$30 sec, die nötig sind, um eine meßbare Spannungsentwicklung auszulösen (Abb. 23), der schnelle Prozeß praktisch bereits beendet ist (Abb. 27d). Nimmt man an, daß der schnelle Prozeß in 2,0 mM EGTA aufgrund der identischen $Ca^{2+}$-Ladungsprozeduren des SR dieselbe Geschwindigkeitskonstante hat wie in 0,41 mM EGTA, so würde er zu einer Endkonzentration an freisetzbarem $Ca^{2+}$ von 2,3 mM führen (Abb. 27d). Die zweite, langsame Komponente der $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR konnte in beiden Typen von Testlösungen ermittelt werden (Abb. 27a). Es ist bemerkenswert, daß sie in allen drei voneinander unabhängigen Serien von Ergebnissen durch dieselbe Geschwindigkeitskonstante ($a_2 = 10^{-3}\ s^{-1}$) charakterisiert werden kann (Abb. 27b). Der Maximalwert der nach diesem langsamen Aufnahmeprozeß ins SR freisetzbaren Gesamtkonzentration ($A_2$) beträgt im Falle von $Ca^{2+}$ in beiden Testlösungen 5 mM und im Falle von $Sr^{2+}$ 3 mM.

Die nach hinreichend langen Ladungszeiten aus dem SR freisetzbare maximale Gesamtkonzentration an Ca- bzw. Sr-Ionen ist nach Gl. (E39) gegeben durch die Summe $A_1+A_2$. Sie beträgt nach den Ergebnissen für die $Ca^{2+}$-Freisetzung in der Testlösung mit 0,41 mM EGTA 5,8 mM Ca und nach den Resultaten in 2,0 mM EGTA

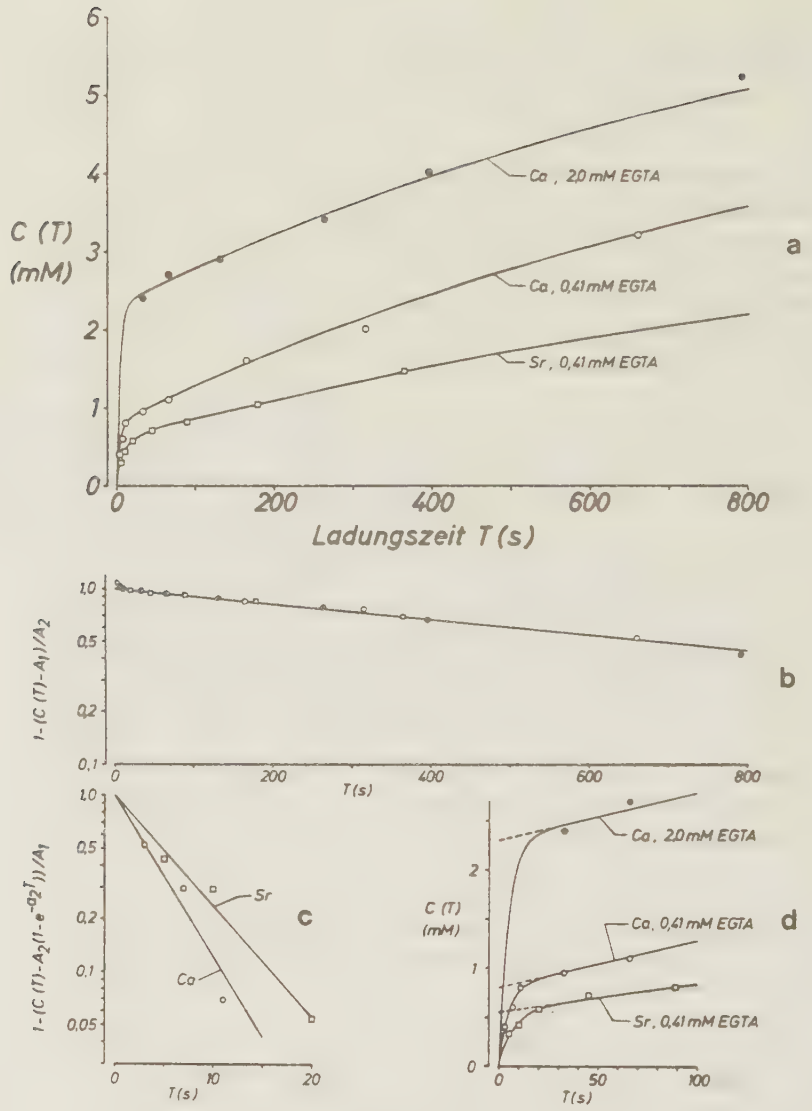



Abb. 27

Text siehe folgende Seite

Abb. 27

Durch 25 mM Coffein aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser freigesetzte Ca- bzw. Sr-Gesamtkonzentration als Funktion der Ladungszeit des SR.

Die eingezeichneten Werte für die freigesetzten Gesamtkonzentrationen von Ca in Testlösungen mit 0,41 mM EGTA (○) und 2,0 mM EGTA (●) und von Sr in 0,41 mM EGTA (□) ergaben die beste Annäherung an die gemessenen Spannungstransienten (Abb. 23 und 26).

(a) Biphasischer Zeitverlauf der während der Ladungsphase aufgenommenen und durch den Coffein-Schritt freigesetzten Ca- und Sr-Gesamtkonzentration (C(T)). Die Kurven folgen der im Text vorgestellten Funktion mit 2 Geschwindigkeitskonstanten.

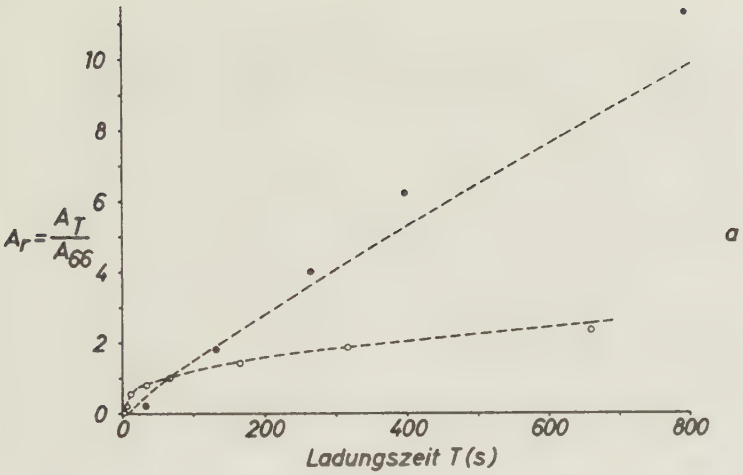
(b) Halblogarithmische Darstellung der Werte aus (a) zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante $a_2$ des langsamen Prozesses.

(c) Halblogarithmische Darstellung der Ergebnisse in 0,41 mM EGTA (a) zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante $a_1$ der schnellen Phase der $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR.

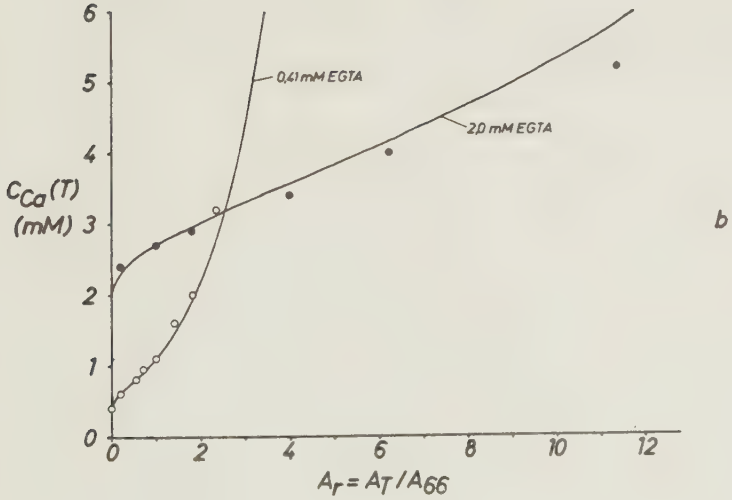
(d) Schnelle Phase der $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR mit einer Andeutung der Endkonzentration, die durch diesen Prozeß erreicht wird (Schnittpunkt der gestrichelten Kurve mit der Ordinate).

7,3 mM Ca. Im Falle von $Sr^{2+}$ ergibt sich eine maximal freisetzbare Sr-Gesamtkonzentration von ca. 3,55 mM. Aus diesen Werten läßt sich die Speicherkapazität des SR der Skelettmuskelfaser für Ca- und Sr-Ionen abschätzen. Nimmt man für das Volumen des SR einen Wert von 10 % des Volumens der gesamten Muskelfaser an (MOBLEY & EISENBERG, 1975), so deuten die oben angegebenen Werte auf eine $Ca^{2+}$-Speicherkapazität des SR der Skelettmuskelfaser von etwa 58-73 mM und auf eine $Sr^{2+}$-Speicherkapazität von ca. 36 mM hin. Vergleicht man nur die unter gleichen Ladungs- und Freisetzungsbedingungen ermittelten Ergebnisse miteinander, so ist die Speicherkapazität des SR für $Ca^{2+}$ etwa 1,6-mal so groß wie für $Sr^{2+}$.

Wie eingangs dieses Kapitels erwähnt wurde, ist u.a. die Fläche unter dem Spannungstransienten der enthäuteten Muskelfaser als Parameter für quantitative Betrachtungen von $Ca^{2+}$-Aufnahme- und und -Freisetzungsprozessen am SR benutzt worden. Die vorgestellte Analyse der Coffein-induzierten Spannungstransienten ermöglicht es, nicht nur eine quantitative Beziehung zwischen der Größe dieser Fläche und der Ladungszeit herzustellen (Abb. 28 A), sondern auch die Größe der Fläche als Annäherung für die freigesetzte Ca-Gesamtkonzentration zu benutzen (Abb. 28b). Die Kurven in Abb. 28a sind deutlich verschieden, obwohl ihnen dieselbe $Ca^{2+}$-Ladungsprozedur des SR zugrunde liegt. Im Falle von 0,41 mM EGTA in der Testlösung steigt die Kurve zunächst rasch und dann nur noch allmählich an, während sie bei 2,0 mM EGTA in der Testlösung quasi linear verläuft. Das unter I-IV vorgestellte Modell kann auch diese Charakteristika recht gut beschreiben. Aus der Abb. 28b geht hervor, daß die EGTA-Konzentration der Testlösung die Beziehung zwischen der aus dem SR freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration und der relativen Fläche unter dem Spannungstransienten wesentlich beeinflußt. Um eine meßbare Spannungsentwicklung und damit eine meßbare Fläche unter dem Transienten zu erhalten, muß eine Ca-Gesamtkonzentration aus dem SR freigesetzt werden, die mindestens der $Ca^{2+}$-Pufferkapazität der Testlösung (EGTA-Konzentration) entspricht. Entsprechend lange muß die vorausgehende $Ca^{2+}$-Ladungsperiode des SR dauern (vgl. Abb. 27a).




a




b

Abb. 28

Text siehe folgende Seite

Abb. 28

Relation zwischen der Fläche unter dem Coffein-induzierten Spannungstransienten und der $Ca^{2+}$-Ladungszeit des SR (a) bzw. der nach der $Ca^{2+}$-Ladungsperiode aus dem SR freisetzbaren Ca-Gesamtkonzentration (b).

(a) Fläche zur Ladungszeit T ($A_T$) relativ zur Fläche zur Zeit T=66 sec ($A_{66}$) in Abhängigkeit von der Ladungszeit für die Testlösung mit 0,41 mM EGTA (o) und 2,0 mM EGTA (●) (s. Abb. 23). Die Flächen unter dem Spannungstransienten wurden gravimetrisch bestimmt.

(b) Im Anschluß an die Ladungszeit T aus dem SR freigesetzte Ca-Gesamtkonzentration, $C_{Ca}(T)$, als Funktion der relativen Fläche unter dem resultierenden Spannungstransienten in der Testlösung mit 0,41 mM (o) und 2,0 mM EGTA (●) (vgl. Abb. 27a).

Die Kurven in (a) und (b) stellen den nach dem vorgestellten Modell (I-IV) erwarteten Verlauf der Beziehungen unter den entsprechenden Bedingungen dar.

### 3.2.6 Einfluß des pH auf die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR

Die Aktivität der $Ca^{2+}$-abhängigen ATPase der SR-Membran wird von dem pH-Wert des Reaktionsmechanismus beeinflußt (TADA et al., 1978). An SR-Vesikelpräparationen wurde eine optimale ATPase-Aktivität im pH-Bereich zwischen 6,5 und 7,5 gemessen (YAMAMOTO & TONOMURA, 1968). Die Tatsache, daß bei basischen pH-Werten die SR-ATPase-Aktivität deutlich reduziert und die Dekomposition des phosphorylierten Enzyms gehemmt ist (YAMAMOTO & TONOMURA, 1968), läßt vermuten, daß auch der $Ca^{2+}$-Transport ins SR vom pH-Wert des Reaktionsmechanismus abhängig ist (vgl. Kap. 1.5). Diese Vermutung wird durch den Befund bestärkt, daß die SR-ATPase-Aktivität eine ähnliche Abhängigkeit vom pCa wie die steady-state-$Ca^{2+}$-Aufnahme des fragmentierten SR zeigt (OGAWA, KUREBAYASHI, IRIMAJIRI & HANAI, 1981), die SR-ATPase-Aktivität also in Beziehung zum $Ca^{2+}$-Transport ins SR steht. Es war deshalb interessant, die $Ca^{2+}$-Aufnahme des SR in situ in Abhängigkeit vom pH an der enthäuteten Faser zu untersuchen.

Für die Experimente wurde die in Kap. 3.2.5 vorgestellte Methode zur repetitiven $Ca^{2+}$-Aufladung und -Freisetzung aus dem SR gewählt. Dabei erfolgte die Freisetzung des gesamten gespeicherten $Ca^{2+}$ durch 25 mM Coffein stets in der gleichen Testlösung mit 0,41 mM EGTA, während die $Ca^{2+}$-Ladung des SR in Aktivierungslösungen mit derselben $Ca^{2+}$-Konzentration, aber verschiedenen pH-Werten erfolgte (Abb. 29). Als Meßsignal für die während der Ladungsphase (15 sec) ins SR aufgenommene Ca-Gesamtkonzentration wurde die Fläche unter dem Coffein-induzierten Spannungstransienten gewählt. Diese zeigt bei der verwendeten EGTA-Konzentration in der Testlösung bereits für kurze $Ca^{2+}$-Ladungszeiten eine recht steile Abhängigkeit von der während der Ladungsphase aufgenommenen und anschließend in der Coffein-Lösung wieder freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration (Abb. 28a,b) und sollte deshalb Änderungen in der $Ca^{2+}$-Aufnahme des SR relativ empfindlich widerspiegeln.
In der Abb. 29 sind Spannungstransienten von zwei verschiedenen Präparaten bei zwei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Bei

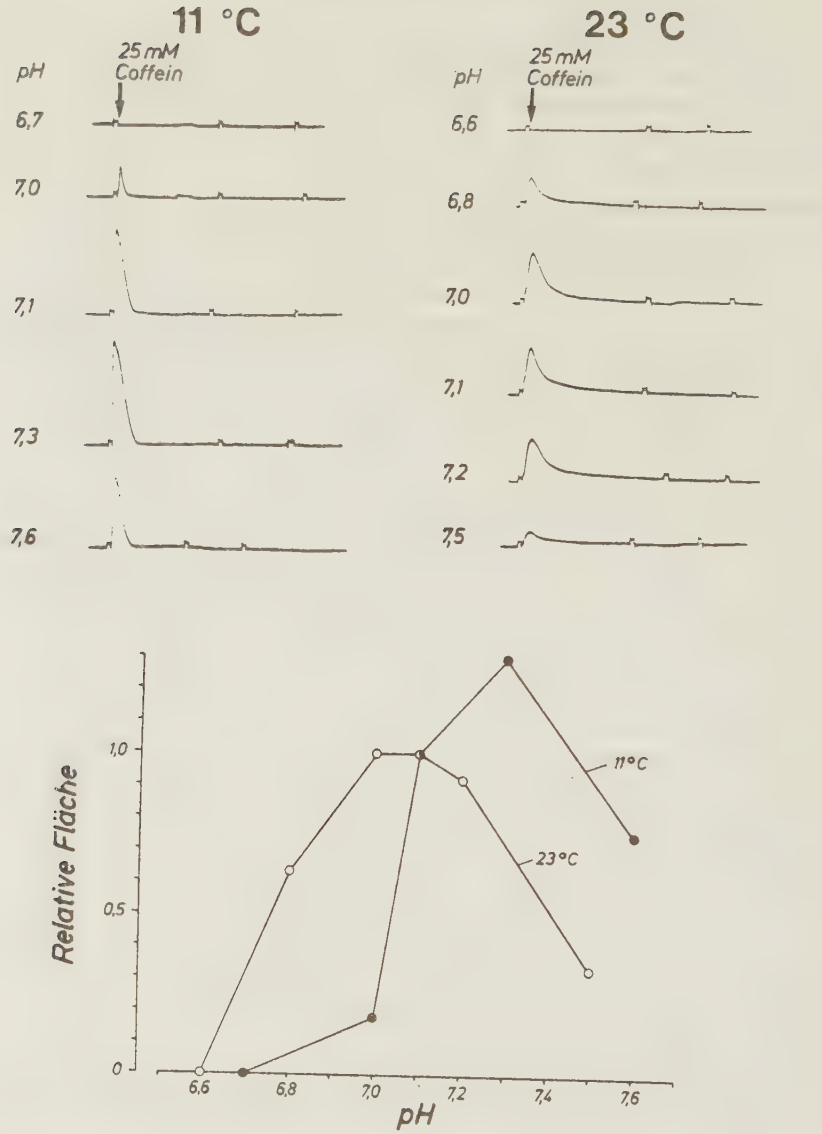



Abb. 29

Text siehe folgende Seite

Abb. 29

Einfluß des pH-Wertes der Ladungslösung auf die $Ca^{2+}$-Aufnahme des SR der enthäuteten Muskelfaser

(oben) Coffein-induzierte Spannungstransienten in einer Testlösung vom Typ H/B mit 0,41 mM EGTA (pH 7,10) im Anschluß an einen $Ca^{2+}$-Ladungsschritt von 15 sec Dauer bei 11 °C und 23 °C. Die Ladungslösungen vom Typ MC/M besaßen dieselbe $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 6,1) und verschiedene pH-Werte (Zahlenwert vor den Spuren). Präparate (11 °C/23 °C): ∅ 80/100 µm, Länge 3,0/2,6 mm.

(unten) Fläche unter dem Coffein-induzierten Spannungstransienten in Abhängigkeit vom pH-Wert der Ladungslösung und der Temperatur (●, 11 °C; o, 23 °C). Die sich nach einem $Ca^{2+}$-Ladungsschritt bei pH 7,1 ergebende Fläche wurde jeweils gleich eins gesetzt.

beiden Temperaturen deutet sich ein "glockenförmiger" Verlauf der Beziehung zwischen der relativen Fläche (und damit der ins SR aufgenommenen $Ca^{2+}$-Gesamtkonzentration) und dem pH der Ladungslösung an. Der $Ca^{2+}$-Transport ins SR hat bei Raumtemperatur ein Optimum zwischen pH 6,9-7,2, während er bei 11 °C etwa zwischen pH 7,1-7,4 optimal verläuft. Im pH-Bereich 6,6-6,7 ist die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR bei beiden Temperaturen so stark verringert, daß die im Anschluß an die Ladungsphase aus dem SR freisetzbare Ca-Gesamtkonzentration die $Ca^{2+}$-Pufferkapazität der Testlösung nicht mehr überwinden und deshalb keine Spannungsentwicklung auslösen kann (vgl. Kap. 3.2.5). Die sich aus den Ergebnissen abzeichnende Verschiebung der Kurve zu höheren pH-Werten bei einer Erniedrigung der Temperatur (Abb. 29) wäre dann eindeutig, wenn alle Ergebnisse an ein und demselben Präparat ermittelt worden wären. Da das nicht der Fall ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese augenscheinliche Verschiebung wenigstens zum Teil auf der Streuung der Ergebnisse an individuellen Präparaten beruht. Eine Temperaturänderung während des Experimentes an ein und demselben Präparat war technisch und wegen der Temperaturabhängigkeit der Affinitätskonstanten der Liganden der Badlösungen für divalente Kationen und Protonen nicht möglich.

# 4. D I S K U S S I O N

Die Ergebnisse der Aktivierungsexperimente am kontraktilen System der enthäuteten Skelettmuskelfaser mit Ba- und Cd-Ionen, deren kontraktionsaktivierende Eigenschaften an diesem Präparat bisher noch nicht untersucht worden sind, zeigen einige interessante Unterschiede zu Ergebnissen von Untersuchungen mit den bekanntermaßen kontraktionsauslösenden Kationen $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$. Sie können zu einem tieferen Verständnis einiger wichtiger Aspekte der Muskelkontraktion beitragen.

Außer $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ kann noch ein weiteres Kation der Gruppe der Erdalkalimetalle, $Ba^{2+}$, und das Schwermetall-Ion $Cd^{2+}$ die kontraktilen Proteine der Skelettmuskelfaser unter weitgehend physiologischen Bedingungen (vgl. Kap. 2.3) aktivieren, d. h., eine Kraftentwicklung auslösen (Kap. 3.1.1 und 3.1.5). Diese Ergebnisse bestätigen die Schlußfolgerungen aus früheren Experimenten an der Skelettmuskelfaser (HEILBRUNN & WIERCINSKI, 1947; CALDWELL & WALSTER, 1963; MATSUMURA & MASHIMA, 1976), daß $Ba^{2+}$ $Ca^{2+}$ als Aktivator des kontraktilen Systems ersetzen kann. Eine kontraktionsaktivierende Wirkung von Cd-Ionen war zwar vermutet (FUCHS, 1974), bisher aber noch nicht direkt nachgewiesen worden.

Es ist interessant, daß beide Ionenarten den kontraktilen Mechanismus aktivieren können, denn es existieren über sie sehr unterschiedliche Daten hinsichtlich der Bindungsfähigkeit an TN-C und der Aktivierbarkeit der Actomyosin-ATPase. Übereinstimmend ist für $Cd^{2+}$ eine hohe und für $Ba^{2+}$ eine sehr geringe Affinität für die $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites des TN-C festgestellt worden (FUCHS, 1974; HARTSHORNE & BOUCHER, 1974). Zwar ist es sicher nicht zulässig, allein aus einer hohen Bindungsfähigkeit eines Ions an ein Rezeptormolekül eine Funktion dieses Ions als Aktivator des Rezeptormoleküls abzuleiten (FUCHS, 1974), dennoch würde man erwarten, daß eine signifikante Bindung des Ions

eine Voraussetzung für seine Wirkung als Aktivator ist. Es ist deshalb erstaunlich, daß $Ba^{2+}$ nicht nur eine kontraktionsauslösende Wirkung hat, sondern auch dieselbe maximale steady-state-Spannung wie $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ auslösen kann (s. Abb. 6 und 8). Die Diskrepanz zwischen der $Ba^{2+}$-Bindung und der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion mag wenigstens zum Teil auf die verschiedenen Präparate (isolierte Proteine - kontraktiler Apparat in situ) zurückzuführen sein, obwohl dieselben Untersuchungen für $Cd^{2+}$ stets Ergebnisse erbracht haben, die im Einklang mit der hier beobachteten kontraktionsaktivierenden Wirkung von $Cd^{2+}$ stehen (s. o.). Betrachtet man die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C ($Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites), die für die Bindung von $Cd^{2+}$ verantwortlich gemacht werden, so ist die Substituierbarkeit von $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ durch Cd-Ionen im Prozeß der Kontraktion wegen der unterschiedlichen Koordinationschemie dieser Ionen jedoch ebenfalls überraschend (FUCHS, 1974; HARTSHORNE & BOUCHER, 1972; 1974). Die Koordinationssphäre dieser $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C wird wahrscheinlich ausschließlich von Sauerstoffatomen (hauptsächlich Carboxylat-Gruppen) gebildet (KRETSINGER et al., 1974; KRETSINGER, 1976). $Ca^{2+}$, das als eine starke Lewis-Säure klassifiziert wird, bindet sich bevorzugt an solche starken basischen Sauerstoff-Donorgruppen (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972). Nach der heutigen Erkenntnis erfolgt die Bindung von $Ca^{2+}$ an $Ca^{2+}$-modulierte Proteine generell über eine Sauerstoffatom-Koordination (WILLIAMS, 1977). Um so erstaunlicher ist es, daß sich $Cd^{2+}$, das als schwache Lewis-Säure eine Bindung an schwache basische Stickstoff- und Schwefel-Donorgruppen bevorzugen sollte (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972; 1974), mit einer relativ hohen Affinitätskonstante an die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C binden und eine Aktivierung des Moleküls auslösen kann. $Cd^{2+}$ hat jedoch auch recht gute Komplexbildungseigenschaften mit Sauerstoff-Donorgruppen (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972), so daß diese entscheidend für die physiologische $Cd^{2+}$-Wirkung sein mögen. Anscheinend kann $Cd^{2+}$ dieselbe maximale relative isometrische Spannung wie $Ca^{2+}$ induzieren (Abb. 12), obwohl diese Aussage aufgrund der Zusammensetzung der Badlösungen (keine Creatin-

kinase, relativ schwache $Cd^{2+}$- und $Ca^{2+}$-Pufferung) trotz der sorgfältigen Kontrolle dieser Lösungen (s. Kap. 2.3.4) nicht mit der gleichen Sicherheit wie im Falle der $Ba^{2+}$-Aktivierung getroffen werden kann.

Im Zusammenhang mit der Betrachtung von Ionen-Bindung und -Aktivierung der kontraktilen Proteine ist bemerkenswert, daß $Ni^{2+}$, für das keine signifikante Bindung an Troponin festgestellt worden ist (FISCHMAN & SWAN, 1967; FUCHS, 1974; HARTSHORNE & BOUCHER, 1974; WINTER et al., 1974), bereits in relativ geringer Konzentration ($10^{-5}$ M $Ni^{2+}$) eine ausgesprochen toxische Wirkung auf den kontraktilen Apparat in situ ausübt (Kap. 3.1.5). Diese Wirkung muß nicht notwendig am TN-C ansetzen. Jedoch scheint aufgrund der irreversiblen Reduktion der Aktivierbarkeit nach einer $Ni^{2+}$-Aktivierung (s. Abb. 14) und der Ähnlichkeit eines $Ni^{2+}$-behandelten Präparates mit Bildern von mit Myosin-Fragmenten inkubierten und aktivierten glycerinisierten Fasern (BORJEDO & OPLATKA, 1976) die kontraktile Einheit direkt betroffen zu sein.

Die qualitativen Ergebnisse der Aktivierungsexperimente zeigen, daß $Ba^{2+}$ und $Cd^{2+}$ zusammen mit $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ zu einer Gruppe spezifischer aktivierender Kationen gehören, die jene Konformationsänderungen am kontraktilen Mechanismus auslösen können, die letztlich zur Aktivierung der Actomyosin-ATPase und zur Kontraktion führen. Als primäres Ereignis in dieser Kette von Ereignissen wird eine durch die Bindung des kontraktionsaktivierenden Kations ausgelöste Konformationsänderung des TN-C selbst angesehen (POTTER, JOHNSON, DEDMAN, SCHREIBER, MANDEL, JACKSON & MEANS, 1977). $Cd^{2+}$ kann im Gegensatz zu $Ba^{2+}$ eine ähnliche Konformationsänderung des TN-C auslösen wie $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ (WINTER et al., 1974). Wegen der Diskrepanz zwischen diesem Ergebnis und denen der vorliegenden Arbeit in bezug auf $Ba^{2+}$, ist es jedoch fraglich, ob diese beobachtete Konformationsänderung der Änderung der dreidimensionalen Struktur des TN-C bei der Aktivierung in vivo entspricht. Man muß erwarten, daß

die durch $Cd^{2+}$ und $Ba^{2+}$ ausgelöste primäre Konformationsänderung eine Reihe weiterer Konformationsänderungen an der kontraktilen Einheit zur Folge hat, damit die Myosin-Actin-Interaktion und damit die Kontraktion stattfinden kann (vgl. z. B. TAYLOR, 1979).

Nach der heutigen Vorstellung über den Mechanismus der Muskelkontraktion (HUXLEY & SIMMONS, 1971; HUXLEY, 1974) erfolgt simultan zur Aktivierung der Kontraktion eine Aktivierung der Actomyosin-ATPase (vgl. z. B. ADELSTEIN & EISENBERG, 1980). Die verfügbaren Daten über die Aktivierbarkeit der Actin-kontrollierten Myosin-ATPase durch divalente Kationen bestätigen die Erwartung, daß neben $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ auch $Cd^{2+}$ und $Ba^{2+}$ die myofibrilläre ATPase aktivieren können. $Cd^{2+}$ induziert etwa 95 % (HARTSHORNE & BOUCHER, 1972) und $Ba^{2+}$ nur etwa 40 - 50 % (TONOMURA, 1973; BERSON, 1974) der maximalen $Ca^{2+}$-induzierten steady-state-ATPase-Aktivität. Die reduzierte Aktivität der $Ba^{2+}$-aktivierten myofibrillären ATPase hat offenbar keinen negativen Einfluß auf die $Ba^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung, denn diese erreicht bei $Ba^{2+}$-Konzentrationen von ca. 13 mM die maximale relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannung (Abb. 6 und 7). Sie könnte jedoch die Ursache für den im Vergleich zur $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung unter ähnlichen Bedingungen (MOISESCU, 1976; STEPHENSON & WILLIAMS, 1981) wesentlich langsameren Zeitverlauf der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung sein (s. Abb. 10). Der relativ langsame Verlauf des Spannungssignals erleichtert eine Untersuchung der Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung (vgl. Kap. 3.1.3).

Bei der Aktivierung des kontraktilen Apparates mit supramaximalen freien Cd-Konzentrationen (1 mM $Cd^{2+}$) sank die $Cd^{2+}$-induzierte Spannung im Anschluß an eine charakteristische Spannungsspitze auf einen steady-state-Wert von ca 40 % des Maximalwertes (Abb. 12 h). Dieses Phänomen läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß CdATP in ähnlicher Weise wie CaATP von der Actomyosin-ATPase zwar hydrolysiert, die dabei freiwerdende Energie jedoch nicht in mechanische Energie transformiert werden kann (s. Kap. 3.1.5; vgl. WEBER et al., 1969). Ein solcher

Verlust der Energie-Transduktion von CdATP auf die kontraktile Einheit könnte nach WEBER et al. (1973) drei verschiedene Ursachen haben. (1) könnte die Bildung eines energiereichen intermediären Reaktionsproduktes (Myosin • ADP • P*), das letztlich mit Actin reagiert (vgl. z. B. TAYLOR, 1979), aus CdATP verhindert sein; (2) könnte ein solcher Komplex, wenn er gebildet wird, eine sehr kurze Lebensdauer haben und seine Energie deshalb nicht für den physikalischen Prozeß im Querbrückencyclus genutzt werden können und (3) könnte der Actomyosin-CdATP-Komplex im Gegensatz zum Actomyosin-Komplex mit MgATP nicht dissoziieren. Der letzte Fall kann wohl aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden, da dann keine partielle Erschlaffung erwartet werden würde, weil die Querbrücken nach Durchlaufen eines Cyclus in einem Kraft-induzierenden Zustand an Actin gebunden blieben (vgl. HUXLEY, 1974). Diese Interpretation beruht auf dem klassischen Schema der ATP-Hydrolyse im Querbrückencyclus (LYMN & TAYLOR, 1971), in dem eine Dissoziation des Actomyosin-ATP-Komplexes obligatorisch ist. Nach neueren Untersuchungen ist jedoch zumindest für die isometrische Kontraktion auch ein ATP-Hydrolyse-Mechanismus ohne diese irreversible Dissoziationsreaktion denkbar (SLEEP & SMITH, 1981).

Bevor die quantitativen Ergebnisse der Experimente am kontraktilen Mechanismus diskutiert werden, soll noch kurz auf eine Konsequenz eingegangen werden, die sich aus der kontraktionsaktivierenden Wirkung von $Cd^{2+}$ ergibt. $Cd^{2+}$ ist in Experimenten an der enthäuteten Faser, in denen eine Änderung der mechanischen Spannung als Indikator für eine $Ca^{2+}$-Netto-Freisetzung oder -Aufnahme ins SR diente (STEPHENSON & PODOLSKY, 1977 a, b), als Inhibitor der $Ca^{2+}$-Transport-ATPase des SR (MAC LENNAN & HOLLAND, 1975) benutzt worden. Aufgrund der aktivierenden Wirkung von $Cd^{2+}$ auf den kontraktilen Apparat besteht in derartigen Experimenten die Gefahr einer Fehlinterpretation des Spannungssignals, wenn nicht die Beteiligung einer $Cd^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung ausgeschlossen bzw. kontrollierbar ist.

In den zitierten Arbeiten von STEPHENSON & PODOLSKY (1977 a, b) ist keine $Cd^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung beobachtet worden, so daß die verwendete freie Cd-Konzentration wahrscheinlich unterhalb des "Schwellenwertes" lag.

Die mit Ba-Ionen ermittelte steady-state-Aktivierungskurve des kontraktilen Systems hat unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen eine andere Charakteristik als die $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aktivierungskurve (Abb. 8). Sie verläuft flacher und kann nach einem Kriterium von MOISESCU et al. (1975) durch einen Hill-Koeffizienten von 2 beschrieben werden. Dieser Hill-Koeffizient deutet an, daß bei der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung mindestens 2 Ba-Ionen an der Reaktionskette innerhalb der funktionellen kontraktilen Einheit, die zur Kraftentwicklung führt, beteiligt sind (vgl. ASHLEY & MOISESCU, 1977). Für die $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-induzierte Spannungsentwicklung wurde in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (JULIAN, 1971; BRANDT et al., 1972; MOISESCU, 1976; ORENTLICHER et al., 1977; FABIATO & FABIATO, 1978 b; MOISESCU & THIELECZEK, 1979; ROBERTSON & KERRICK, 1979; STEPHENSON & WILLIAMS, 1981) dagegen eine Beteiligung von mindestens 4 aktivierenden Ionen am Kontraktionsprozeß der kontraktilen Einheit gefunden. Die letzteren Ergebnisse lassen sich gut mit den 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C (POTTER & GERGELY, 1975) korrelieren. Zwar wird eine regulatorische Funktion aller 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C aufgrund biochemischer Untersuchungen am isolierten Protein angezweifelt (JOHNSON et al., 1979; ROBERTSON et al., 1981), jedoch scheinen bei der enthäuteten schnellen Skelettmuskelfaser alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C an der Regulation der Kontraktion beteiligt zu sein (MOISESCU, 1976; STEPHENSON & WILLIAMS, 1981). Betrachtet man die Ergebnisse der $Ba^{2+}$-induzierten steady-state-Aktivierung vor dem Hintergrund dieser strukturellen und funktionellen Gegebenheiten, so scheint der kontraktile Mechanismus in Gegenwart von $Ba^{2+}$ im Vergleich zu $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ verändert zu reagieren. Ein Hill-Koeffizient von 2 schließt jedoch nicht aus, daß dem $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktionsvorgang eine Bindung von $Ba^{2+}$

an alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C vorausgeht (MOISESCU et al., 1975; ASHLEY & MOISESCU, 1977; vgl. Kap. 5.3). Es hängt dann von der relativen Größe der Gleichgewichtskonstanten der Bindungsreaktionen zueinander ab, welche apparente Kooperativität in der beobachteten Aktivierungskurve zum Ausdruck kommt (KOSHLAND, 1970; ASHLEY & MOISESCU, 1977; vgl. Kap. 3.1.4 und 5.3).

Interessanterweise sind jedoch auch die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung unter der Annahme einer Beteiligung von nur 2 Ba-Ionen pro kontraktiler Einheit an der Kontraktion erklärbar (Kap. 3.1.3). Der Zeitverlauf der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung in Abhängigkeit von der freien Ba-Konzentration konnte in dem $Ba^{2+}$-Konzentrationsbereich pBa 4,00 - 3,15 unter der Annahme eines konsekutiven Reaktionsschemas mit zwei $Ba^{2+}$-abhängigen Reaktionsschritten rekonstruiert werden (Abb. 10). Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Relaxation der $Ba^{2+}$-induzierten Spannung ($k_{-2}$ = 2,3 $s^{-1}$) ist derjenigen der Relaxation der $Ca^{2+}$-induzierten Spannung (MOISESCU, 1976) und der Relaxationsrate der intakten Frosch-Skelettmuskelfaser in vivo (HUXLEY & SIMMONS, 1972) sehr ähnlich. Dieser Befund unterstützt die These, daß die Relaxationsrate der Muskelfaser in vivo zu einem wesentlichen Teil durch die Eigenschaften des kontraktilen Mechanismus selbst und nicht des Sarcoplasmatischen Reticulums bestimmt wird (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981).

Die bisher diskutierten Ergebnisse der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung deuten darauf hin, daß für die Regulation der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion nur eine der beiden Klassen von $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C verantwortlich ist. Aufgrund der kompetitiven Hemmung der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung durch eine Erhöhung der freien Mg-Konzentration von 1 mM auf 3 mM (Kap. 3.1.2), scheint es sich dabei um die Klasse der $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsstellen zu handeln. Eine vergleichbare Beeinflussung der Aktivierungskurve durch die Veränderung der

freien Mg-Konzentration ist auch für die $Ca^{2+}$-Aktivierung (FABIATO & FABIATO, 1975; ASHLEY & MOISESCU, 1977; STEPHENSON & FORREST, 1980) und $Sr^{2+}$-Aktivierung (DONALDSON & KERRICK, 1975; THIELECZEK, 1977) des kontraktilen Systems beschrieben worden. Die Ergebnisse zeigen im Gegensatz zu Ergebnissen aus Untersuchungen am isolierten TN-C und Actomyosin (POTTER, GERGELY, 1975; JOHNSON et al., 1979; GRABAREK et al., 1981), daß auch die Klasse der $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-sites des TN-C eine regulatorische Funktion bei der Muskelkontraktion besitzt (vgl. STEPHENSON & WILLIAMS, 1981). Nach neueren Untersuchungen scheinen diese Bindungsstellen eher durch einen $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Austausch als durch eine Bindung von $Ca^{2+}$ an die freien Bindungsstellen aktiviert zu werden (ROBERTSON et al., 1981).

Ein sehr interessantes Ergebnis, das zu einem Verständnis der veränderten Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung beitragen kann, ergab sich aus der Untersuchung der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung in Gegenwart einer unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration (Kap. 3.1.4). Die Ca-Aktivierungskurve wurde in Gegenwart von $Ba^{2+}$ nicht, wie man aufgrund der additiven Wirkung der zwei kontraktionsaktivierenden Ionenarten erwarten würde, in Richtung auf geringere freie Ca-Konzentrationen verschoben, sondern sie verringerte ihre Steilheit, ohne ihre Lage auf der pCa-Achse wesentlich zu verändern (Abb. 11). Die dadurch zum Ausdruck kommende Abnahme der Kooperativität zwischen den $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß sich $Ba^{2+}$ an eine Klasse der $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C mit einer viel höheren Affinitätskonstante als $Ca^{2+}$ binden kann (Abb. 11) und dadurch die beiden Klassen von Bindungsstellen "funktionell entkoppelt" werden. Diese Entkopplung drückt sich im Reaktionsmechanismus der kontraktilen Einheit dadurch aus, daß durch die $Ba^{2+}$-Bindung die Gleichgewichtskonstante einer intermediären Bindungsreaktion des konsekutiven Reaktionsschemas, das zur Kraftentwicklung führt, drastisch reduziert wird (vgl. Kap. 5.3). Die Beeinflussung der Ba-Aktivierungskurve durch die freie Mg-Kon-

zentration (Kap. 3.1.2) deutet darauf hin, daß die Entkopplung der regulatorischen Untereinheiten durch die Bindung von Ba-Ionen an die $Ca^{2+}$-spezifischen Bindungsstellen des TN-C verursacht wird. Diese Modellvorstellung kann die Ba-Aktivierungskurve und die Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung auf der Basis aller $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C und die Verringerung der Steilheit der Ca-Aktivierungskurve in Gegenwart von $Ba^{2+}$ erklären (vgl. Kap. 5.3). Sie allein liefert jedoch keine Erklärung für das interessante Ergebnis einer sowohl fördernden (für $pCa \gtrsim 6{,}3$; s. Abb. 11) als auch hemmenden Wirkung (für $pCa \lesssim 6{,}3$) einer unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration auf die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Kontraktion (Kap. 3.1.4). In dem Kap. 3.1.4 und 5.3 wurde ein Reaktionsmodell der kontraktilen Einheit vorgestellt, das unter Berücksichtigung aller $Ca^{2+}$-Bindungsstellen beide Wirkungen von $Ba^{2+}$ (Abflachung der Ca-Aktivierungskurve; Förderung und Hemmung der $Ca^{2+}$-induzierten Kontraktion) auf die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung bemerkenswert gut beschreiben kann (Abb. 11). Es enthält als wesentliche Punkte die folgenden Vorstellungen: (1) die kontraktile Einheit kann nur Kraft entwickeln, wenn alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C heterogen oder homogen mit $Ca^{2+}$ und/oder $Ba^{2+}$ besetzt sind; (2) eine bestimmte, vollständig und heterogen mit $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ besetzte regulatorische Einheit aktiviert die kontraktile Einheit nicht.

Zum Abschluß der Diskussion der quantitativen Ergebnisse der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung sei noch auf die folgende auffallende Übereinstimmung hingewiesen: Die $Ba^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung ähnelt sowohl in bezug auf die steady-state-Ergebnisse als auch hinsichtlich der Kinetik sehr stark der $Ca^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung von enthäuteten langsamen twitch-Muskelfasern (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981). Der $Ca^{2+}$-Regulationsmechanismus der Kontraktion dieser Muskelfasern ist wahrscheinlich wesentlich verschieden von dem der schnellen Skelettmuskelfasern (STEPHENSON & WILLIAMS, 1981). Aufgrund der angedeuteten Ähnlichkeiten gewinnt man den Eindruck, daß der kon-

traktile Mechanismus der enthäuteten schnellen Skelettmuskelfaser in Gegenwart von $Ba^{2+}$ reversibel in einen funktionellen Zustand überführt wird, der dem der langsamen twitch-Muskelfaser gleicht. Bei allem Vorbehalt mag dabei die diskutierte, durch $Ba^{2+}$-induzierte funktionelle Entkopplung der beiden Klassen von $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Untereinheit der kontraktilen Einheit eine Rolle spielen.

Aus einer vergleichenden Betrachtung der Aktivierungskurven des kontraktilen Mechanismus der enthäuteten Skelettmuskelfaser für die untersuchten Kationen $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$, $Ba^{2+}$ und $Cd^{2+}$ (Kap. 3.1.6) ließ sich die folgende Sequenz für die Empfindlichkeit des kontraktilen Mechanismus für diese kontraktionsauslösenden Ionen bestimmen: $Ca^{2+} \gtrsim Cd^{2+} > Sr^{2+} \gg Ba^{2+}$. Die Werte der Empfindlichkeit des kontraktilen Apparates für $Sr^{2+}$ und $Ba^{2+}$ relativ zu denen für $Ca^{2+}$ ($s_{Sr}(P_{0,5}) = 1/36$; $s_{Ba}(P_{0,5}) = 1/870$; s. Tab. 3) entsprachen recht gut den relativen Empfindlichkeiten von isoliertem nativen Actomyosin für diese Ionen (EBASHI et al., 1969). Je mehr sich ein kontraktionsauslösendes divalentes Kation der Größe des Ca-Ions (Ionenradius 0,99 Å) annähert, desto größer ist die Sensitivität der regulatorischen Einheit des kontraktilen Mechanismus für dieses Ion (Abb. 15). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C divalente Kationen nach ihrer Größe selektieren (FUCHS, 1974). Dabei werden im Einklang mit Ergebnissen von Bindungsstudien (FUCHS, 1974) und Untersuchungen der Actomyosin-ATPase-Aktivität (TONOMURA, 1973) Ionen von der Größe des $Ca^{2+}$ bevorzugt. Bemerkenswert ist, daß $Ba^{2+}$ trotz seiner Größe und seiner relativ geringen Sensitivität für das kontraktile System die maximale isometrische Spannung auslösen kann. Die Ursache für die diskutierte ausbleibende "Aktivierung" einer Klasse von $Ca^{2+}$-Bindungsstellen durch $Ba^{2+}$ - und damit für den augenscheinlichen Verlust an Kooperativität - mag in der mangelnden Anpassung dieses Ions an die Koordinationsgeometrie der betreffenden Bindungsstellen (FUCHS, 1974; WINTER et al., 1974) zu suchen sein. Vermutlich verursacht $Ba^{2+}$ trotz seiner hohen Affinität für diese $Ca^{2+}$-

Bindungsstellen nicht eine adäquate lokale oder globale Konformationsänderung (vgl. WILLIAMS, 1977) des TN-C-Moleküls bzw. des TN-Komplexes, so daß es nicht dieselbe hohe Kooperativität zwischen den $Ca^{2+}$-bindenden Untereinheiten der kontraktilen Einheit wie $Ca^{2+}$ oder $Sr^{2+}$ induzieren kann.

Die Ergebnisse der Experimente am SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser können zu einem besseren Verständnis des Mechanismus der $Ca^{2+}$- und Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR beitragen und eine Vorstellung von der Speicherkapazität des SR für $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ *in situ* vermitteln. Diese beiden Aspekte sind nach heutigem Wissensstand für die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR und den $Ca^{2+}$-Umsatz während der twitch-Kontraktion in vivo von großer Bedeutung (vgl. ENDO, 1977). Es wurde in diesen Experimenten besonderer Wert auf physiologische Randbedingungen (insbesondere physiologische Konzentration an $Mg^{2+}$ und monovalenten Kationen) gelegt, weil die Fülle von Daten aus Untersuchungen unter eher unphysiologischen Bedingungen die Vorstellungen über die betreffenden Vorgänge in vivo vielfach verwirrt haben, anstatt Klarheit zu schaffen (vgl. Kap. 1.2 und 1.5).

Im Kap. 3.2.2 wurde direkt nachgewiesen, daß an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Gegenwart einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration von 1 mM eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR bereits durch eine Erhöhung der freien Ca-Konzentration an der SR-Oberfläche auf Werte zwischen $4 \cdot 10^{-7}$ - $10^{-6}$ M ausgelöst werden kann. Freie Ca-Konzentrationen in dieser Größenordnung werden während der twitch-Kontraktion im Myoplasma erreicht (BLINKS et al., 1978), so daß dem Mechanismus der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aufgrund dieser Ergebnisse eine wesentliche Bedeutung bei der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in vivo zugemessen werden muß. Diese Auffassung steht im Gegensatz zu der Interpretation von $Ca^{2+}$-Freisetzungsexperimenten an der enthäuteten Faser bei 0,9 mM $Mg^{2+}$ mit einer indirekteren Nachweismethode (ENDO, 1975 a; 1977; ENDO & THORENS, 1975 a). Danach tritt die $Ca^{2+}$-induzierte

$Ca^{2+}$-Freisetzung erst bei unphysiologisch hohen $Ca^{2+}$-Konzentrationen ($>10^{-4}$ M) auf, so daß sie nicht als wesentlich für die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in vivo erachtet wurde. Bevor einige weitere Ergebnisse erörtert werden, die die physiologische Bedeutung der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung belegen, sollen einige sich aus den Experimenten ergebende Randbedingungen diskutiert werden, die sich für das Auftreten einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung als wichtig erwiesen haben.

Eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR konnte unter zwei verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 18 und 19). In Lösungen mit einer hohen $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (EGTA + CaEGTA = 50 mM) war eine schnelle Erhöhung der freien Ca-Konzentration an der SR-Oberfläche für eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR nötig (Abb. 18), während in Lösungen mit geringer $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (80 µM EGTA) ein relativ langsamer Aktivierungsschritt (Abb. 19) hinreichend war. Diese Ergebnisse deuten an, daß für die Auslösung einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung nicht allein die Einstellung einer "Schwellen-$Ca^{2+}$-Konzentration" an der SR-Oberfläche, sondern auch die Geschwindigkeit, mit der dieser Schritt erfolgt, wichtig ist (vgl. FABIATO & FABIATO, 1979 b).

Als ein weiterer wichtiger Faktor, der die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung beeinflußt, wird der $Ca^{2+}$-Ladungszustand und damit der $Ca^{2+}$-Gehalt des SR angesehen (ENDO, 1975 a; 1977). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Ansicht, denn eine erhöhte $Ca^{2+}$-Beladung des SR hatte eine verstärkte $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung zur Folge (Abb. 19 a - h). Jedoch war im Gegensatz zu anderen Untersuchungen (ENDO, 1975 a; 1977) keine unphysiologisch hohe Beladung des SR mit $Ca^{2+}$ für das Auftreten einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung nötig. Auch an Präparaten, deren SR im Anschluß an die Präparation nicht mit $Ca^{2+}$ beladen worden war und die deshalb in etwa einen physiologischen $Ca^{2+}$-Ladungszustand besitzen sollten,war eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR durch physiologische $Ca^{2+}$-Stimuli induzierbar (Abb. 19 a - c).

Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls das Konzept einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung für die $Ca^{2+}$-Ausschüttung aus dem SR in vivo.

Auch die graduierte $Ca^{2+}$-Nettoausschüttung aus dem SR, die vielfach für eine Erklärung der potentialabhängigen graduierten Aktivierbarkeit individueller Myofibrillen der Skelettmuskelfaser (COSTANTIN & TAYLOR, 1973) gefordert worden war (vgl. STEPHENSON, 1981 a), konnte in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (ENDO, 1975 a) demonstriert werden (Abb. 19). Bemerkenswerterweise konnten dabei im Unterschied zu der Untersuchung von ENDO (1975 a) bereits $Ca^{2+}$-Konzentrationen von $\approx 4 \cdot 10^{-7}$ - $10^{-6}$M eine graduierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auslösen. Dieser Befund zeigt, daß eine graduierte $Ca^{2+}$-Freisetzung durchaus mit einem regenerativen $Ca^{2+}$-Freisetzungsmechanismus vereinbar ist (vgl. STEPHENSON, 1981 a).

Die Diskrepanz zwischen den vorliegenden Ergebnissen und denen anderer Autoren (ENDO, 1975 a; 1977; ENDO & THORENS, 1975 a; THORENS & ENDO, 1975) im Hinblick auf die Bedeutung einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung bei der Aktivierung der Skelettmuskelfaser in vivo mag zum Teil durch einen unkontrollierbaren Verlust von Regulationsfunktionen des $Ca^{2+}$-Freisetzungsmechanismus bei der Präparation der enthäuteten Faser erklärbar sein. Ein wichtiger Parameter, der den Mechanismus der $Ca^{2+}$-Freisetzung in vivo kontrolliert, ist das Membranpotential des T-Systems (vgl. LÜTTGAU & MOISESCU, 1977). Die Existenz eines Membranpotentials des rudimentären T-Systems der enthäuteten Faser war jedoch für das Auftreten einer $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung nicht essentiell (Abb. 19 i-l). Allerdings schien die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR erleichtert gewesen zu sein, wenn das T-System der enthäuteten Faser vor der Präparation nicht effektiv depolarisiert worden war (Abb. 19).

Die Untersuchung der $SCN^-$-Wirkung auf das SR der enthäuteten Faser (Kap. 3.2.3) unter Bedingungen (0,1 mM $Mg^{2+}$), die die

$Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR erleichtern (vgl. ENDO, 1977; STEPHENSON, 1981 a), hat erstmals direkte Hinweise auf eine Kontrolle der $Ca^{2+}$-Freisetzung durch den potentialabhängigen T-SR-Kopplungsmechanismus erbracht. Unter diesen Bedingungen konnte weder durch 1 mM Coffein noch durch 1 - 10 mM $SCN^-$ allein, sondern stets nur durch 1 mM Coffein und 1 mM $SCN^-$ eine meßbare $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem annähernd physiologisch mit $Ca^{2+}$ beladenen SR ausgelöst werden (Abb. 20). Nach neueren Untersuchungen greift Coffein in den Mechanismus der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung ein, indem es unabhängig von $Ca^{2+}$ die Freisetzung einer geringen Menge von $Ca^{2+}$ aus dem SR verursacht, die dann sekundär durch den $Ca^{2+}$-abhängigen $Ca^{2+}$-Freisetzungsmechanismus verstärkt wird (STEPHENSON, 1979; 1981 a, b). $SCN^-$, das an der intakten Muskelfaser die Kopplung zwischen der T-System-Depolarisation und der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR verbessert (HODGKIN & HOROWICZ, 1960 b; SPIECKER et al., 1979), greift dagegen vermutlich an den potentialabhängigen T-SR-Kopplungsmechanismus an (MELZER, 1980). Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man schließen, daß die Wirkung von Coffein auf das SR in situ zumindest bei relativ geringen Coffein-Konzentrationen der Kontrolle des vom Membranpotential des T-Systems kontrollierten T-SR-Kopplungsmechanismus unterliegt. Diese Interpretation steht im Einklang mit der durch geringe Coffein-Konzentrationen verursachten Veränderung des membranpotential-abhängigen Aktivierungsprozesses intakter Muskelfasern (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968; CAPUTO, GOTTSCHALK & LÜTTGAU, 1981). Es liegt nahe anzunehmen, daß der Ansatzpunkt der Kontrolle des Coffein-Wirkungsmechanismus durch den potentialabhängigen T-SR-Kopplungsmechanismus nicht der Primärprozeß eines Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR ist, sondern der Sekundärprozeß, die $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung. Über den gleichen Kontrollmechanismus wäre dann eine Regulation der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in vivo in Abwesenheit der Droge möglich.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung an der enthäuteten Faser scheint u.a. ein vom Zellinneren her zugäng-

liches "$SCN^-$-sensitives" Element des T-SR-Kopplungsmechanismus an der Kontrolle der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung beteiligt zu sein. Es ist gut möglich, daß diese Kontrollfunktion bei der Präparation der enthäuteten Muskelfaser häufig verloren geht und dadurch eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR in situ nur schwer oder gar nicht auslösbar ist. Das könnte erklären, warum es bisher insbesondere an SR-Vesikel-Präparaten so schwierig ist, diesen Prozeß experimentell nachzuweisen (vgl. ENDO, 1977).

Die Untersuchung der Wirkung von Coffein auf das SR der enthäuteten Faser (Kap. 3.2.1) bestätigt die aus anderen Untersuchungen bekannte Abhängigkeit der Coffein-Wirkung von der freien Ca-Konzentration der Badlösung und vom $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR (ENDO, et al., 1970; ENDO, 1975b; 1977). Die Tatsache, daß es in Coffein-haltigen Badlösungen mit hoher $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (50 mM EGTA) nicht zu so einer massiven $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR kam wie in Coffein-Badlösungen mit geringer $Ca^{2+}$-Pufferkapazität (0,1 mM EGTA; s. Abb. 17), ist gut mit der im Zusammenhang mit der $SCN^-$-Wirkung diskutierten Vorstellung über den Coffein-Wirkungsmechanismus auf das SR zu erklären (STEPHENSON, 1979; 1981a,b).

Bei der Vermittlung der Wirkung des Coffeins auf das SR scheint die Doppelbindung am Stickstoff in der 9-Position des Purinringes des Moleküls von besonderer Bedeutung zu sein, denn von den untersuchten Methylxanthinen konnten nur diejenigen eine meßbare $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR auslösen, die in dieser Position nicht substituiert waren (Abb. 21). Am Frosch-Herzmuskel wurde eine vergleichbare Abhängigkeit der $Ca^{2+}$-freisetzenden Wirkung der Methylxanthine auf das SR von dieser Molekülstruktur gefunden (CHAPMAN & MILLER, 1974 b). Eine neuere Untersuchung der Wirkung von Coffein und strukturell verwandten Substanzen auf die intakte Skelettmuskelfaser (HOWELL, JONES & MAYOR, 1981) deutet jedoch an, daß der in bezug auf die $Ca^{2+}$-freisetzende Wirkung am SR aktive Teil des Moleküls nicht auf die Doppelbindung und das Stickstoffatom in der 9-Position be-

grenzt ist. Die Wirkung der aktiven Methylxanthine in diesen Experimenten beruhte sicher nicht auf der Hemmung einer Phosphodiesterase, denn ein anderer wirksamer Phosphodiesterase-Inhibitor, R07-2956, der kein Methylxanthin ist (TSIEN, 1974), konnte weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von cAMP eine meßbare $Ca^{2+}$-Freisetzung auslösen.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Zeitverlaufs von Coffein-induzierten Spannungstransienten in Abhängigkeit vom $Ca^{2+}$-Ladungszustand des SR der enthäuteten Skelettmuskelfaser konnten mit Hilfe eines Modells quantitativ beschrieben werden (Kap. 3.2.5). Dem Modell liegt die Annahme eines relativ langsam abnehmenden Coffein-induzierten $Ca^{2+}$- bzw. $Sr^{2+}$-Efflux aus dem SR zugrunde, der die charakteristische langsame Relaxation der Spannungstransienten gut annähern kann (Abb. 25). Die Geschwindigkeitskonstante des $Ca^{2+}$-Efflux war mit $0{,}08 s^{-1}$ derjenigen des Coffein-induzierten mittleren $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR der enthäuteten Faser (STEPHENSON, 1981b) sehr ähnlich. Aus der Abb. 25 wird deutlich, daß der aus der kompletten Freisetzung des gespeicherten $Ca^{2+}$ resultierende Spannungstransient nur einen Teil der durch den $Ca^{2+}$-Efflux aus dem SR freigesetzten Ca-Gesamtkonzentration widerspiegelt. Dennoch war mit Hilfe der Modellvorstellung eine gute Beschreibung der Spannungstransienten in Abhängigkeit von der während der Ladungsperiode ins SR aufgenommenen und in der Coffein-Lösung wieder freigesetzten Ca- bzw. Sr-Gesamtkonzentration möglich (Abb. 23 und 26).

Die Auswertung der Ergebnisse ergab einen biphasischen Zeitverlauf für die $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR. In der $Ca^{2+}$-Freisetzungslösung mit 0,41mM EGTA ist eine schnelle Phase der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR mit einer Geschwindigkeitskonstante von $0{,}21 s^{-1}$ feststellbar. Die Gesamtkonzentration an freisetzbarem $Ca^{2+}$, die durch diesen Prozeß ins SR aufgenommen werden kann, lag zwischen 0,8mM (ermittelt für die Coffein-Lösung mit 0,41mM EGTA) und 2,3mM (für die Coffein-Lösung mit 2,0mM EGTA). Der kleinere Wert ist wahrscheinlich eine Unterschätzung, da in der $Ca^{2+}$-Freisetzungslösung mit 0,41mM EGTA die freigesetzte

lokale $Ca^{2+}$-Konzentration innerhalb des Präparates über diejenige des EGTA hinaus ansteigen könnte. Dann träfe die Annahme, daß das gesamte $Ca^{2+}$ praktisch in der Form von CaEGTA mit einem einheitlichen Diffusionskoeffizienten aus dem Modellzylinder hinausdiffundiert, nicht mehr zu, weil ein Teil des gesamten $Ca^{2+}$ als freies Ion diffundieren würde. Das wäre gleichbedeutend mit einem höheren apparenten Diffusionskoeffizienten für Ca als er im Modell angenommen wurde und würde zu niedrige Gesamtkonzentrationen an freisetzbarem $Ca^{2+}$ ergeben. Der in der $Ca^{2+}$-Freisetzungslösung mit 2,0mM EGTA ermittelte Wert einer freisetzbaren Ca-Gesamtkonzentration von 2,3mM ist dagegen wahrscheinlich eine Überschätzung. Der lokale pH-Wert könnte in dieser Lösung eher als in der Lösung mit der niedrigeren EGTA-Konzentration infolge der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR und der $Ca^{2+}$-Bindung an EGTA signifikant sinken. Diese pH-Änderung hätte eine Abnahme der apparenten Affinitätskonstante von EGTA für $Ca^{2+}$ und dadurch indirekt eine Erhöhung der lokalen $Ca^{2+}$-Konzentration zur Folge (MOISESCU & THIELECZEK, 1978a). Man würde also in diesem Fall eine höhere Konzentration an freigesetztem $Ca^{2+}$ annehmen, als eigentlich vorhanden ist.

Die zweite, langsame Komponente der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR konnte in beiden Typen von Coffein-Lösungen charakterisiert werden. Sie besitzt in beiden Fällen dieselbe Geschwindigkeitskonstante von ca. $10^{-3}s^{-1}$ und denselben Maximalwert für die freisetzbare Ca-Gesamtkonzentration von 5mM.

Bei der Annahme eines SR-Volumens von 10% des gesamten Faservolumens (MOBLEY & EISENBERG, 1975), deuten diese Ergebnisse auf eine maximale $Ca^{2+}$-Speicherkapazität des SR in situ von 58-73mM hin. Die maximale Speicherkapazität des SR für $Sr^{2+}$ ist etwa um den Faktor 1,6 kleiner als für $Ca^{2+}$. Diese Werte sind etwa 3-4 mal so hoch wie Daten aus älteren Untersuchungen

der SR-Speicherkapazität an SR-Vesikeln (WEBER et al., 1963; 1966)und enthäuteten Muskelfasern (FORD & PODOLSKY, 1972a). Sie stimmen jedoch gut mit Ergebnissen aus neueren Untersuchungen an leichten und schweren SR-Vesikeln überein, die für die terminale Cysterne des SR einen endogenen $Ca^{2+}$-Gehalt von ca. 50 mM und für das longitudinale SR einen endogenen $Ca^{2+}$-Gehalt von etwa 5 mM ergeben haben (CAMPBELL et al., 1980). Aufgrund der guten Übereinstimmung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit diesen Daten über den nativen $Ca^{2+}$-Gehalt des SR kann angenommen werden, daß das SR der enthäuteten Faser durch den Ladungsprozeß nicht unphysiologisch hoch mit Ca-Ionen beladen worden war. Basierend auf den niedrigeren Werten für die $Ca^{2+}$-Speicherkapazität des SR wurde abgeschätzt, daß während einer einzelnen twitch-Kontraktion mehr als 1/4 des insgesamt im SR vorhandenen $Ca^{2+}$ aus dem SR ausgeschüttet wird (ENDO, 1977). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten über die $Ca^{2+}$-Speicherkapazität des SR lassen dagegen vermuten, daß der "Sicherheitsfaktor" zwischen dem $Ca^{2+}$-Gehalt und dem $Ca^{2+}$-"Verlust" des SR während einer twitch-Kontraktion deutlich größer ist, als bisher angenommen wurde.

Die schnelle Phase der $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR der enthäuteten Muskelfaser hatte einen ähnlichen Zeitverlauf wie die $Ca^{2+}$-Aufnahme der im Zusammenhang mit der Diskussion der SR-Speicherkapazität betrachteten SR-Vesikel-Präparation (CAMPBELL & SHAMOO, 1980). Es bleibt noch in weiteren Experimenten zu klären, ob der beobachtete Zeitverlauf mit der Rate der Erschlaffung der Muskelfaser in vivo zu korrelieren ist (vgl. ENDO, 1977).

Die $Ca^{2+}$-Aufnahme ins SR der enthäuteten Muskelfaser wurde durch den pH-Wert der Badlösung in ähnlicher Weise beeinflußt, wie die SR-ATPase-Aktivität von Vesikelpräparaten (YAMAMOTO & TONOMURA, 1968). Für die Reduktion der $Ca^{2+}$-Aufnahme bei zunehmend basischen pH-Werten könnte eine pH-abhängige Hemmung der ATPase-Aktivität und des $Ca^{2+}$-Transports verantwortlich sein (YAMAMOTO & TONOMURA, 1968). Bei der Hemmung der $Ca^{2+}$-Aufnahme bei pH-Werten $< 7$ könnte eine Verringerung der apparenten $Ca^{2+}$-Affinität von Bindungsstellen des $Ca^{2+}$-Transportmechanismus eine Rolle spielen.

# 5. A N H A N G

## 5.1 Berechnung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP ($Lapp_{Ba}^{ATP}$) in Gegenwart monovalenter physiologischer Kationen

Für die $Ba^{2+}$-Aktivierungsexperimente an Myofibrillenbündeln war es nötig, das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP zu bestimmen (s. Kap. 3.1.1 ). In Kap. 2.3.3 ist die experimentelle Ermittlung dieses Löslichkeitsproduktes in Lösungen mit derselben Zusammensetzung an monovalenten Kationen (137 mM $K^+$, 36 mM $Na^+$, pH 7,10) wie die $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen dargestellt. Der dabei verwendete Reaktionsansatz besaß im Gleichgewichtszustand einen Bodenkörper aus ungelöstem BaATP und einen mit BaATP gesättigten Überstand. Die ionale Situation in der flüssigen Phase dieses heterogenen Systems kann aufgrund der physikochemischen Daten von ATP (SILLÉN & MARTELL, 1964; 1970) bei einem pH 7,10 durch folgende Reaktionen beschrieben werden:

(A1) $H^+ + ATP^{4-} \overset{K_H}{\rightleftharpoons} HATP^{3-}$

(A2) $K^+ + ATP^{4-} \overset{K_K}{\rightleftharpoons} KATP^{3-}$

(A3) $Na^+ + ATP^{4-} \overset{K_{Na}}{\rightleftharpoons} NaATP^{3-}$

(A4) $Ba^{2+} + ATP^{4-} \overset{K_{Ba}}{\rightleftharpoons} BaATP^{2-}$

$K_H$, $K_K$, $K_{Na}$ und $K_{Ba}$ sind die "absoluten" Affinitätskonstanten für $H^+$, $K^+$, $Na^+$ und $Ba^{2+}$. Die Bildung des BaATP-Komplexes (Gl. (A4)) läßt sich durch Einführung einer "apparenten" Reaktion, in der die Reaktionen (A1) - (A4) enthalten sind, einfacher formulieren:

(A5) $Ba^{2+} + ATP_f \overset{Kapp_{Ba}^{ATP}}{\rightleftharpoons} BaATP$

Die auf diese Weise definierte apparente Bindungskonstante von ATP für $Ba^{2+}$, $Kapp_{Ba}^{ATP}$, wird durch die Konzentration der freien Ionen in der Lösung ($[H^+]$, $[K^+]$, $[Na^+]$) und die absoluten Bindungskonstanten von ATP für die betreffenden Ionenarten bestimmt:

$$(A6) \quad Kapp_{Ba}^{ATP} = K_{Ba} \cdot (1 + [H^+] \cdot K_H + [K^+] \cdot K_K + [Na^+] \cdot K_{Na})^{-1}$$

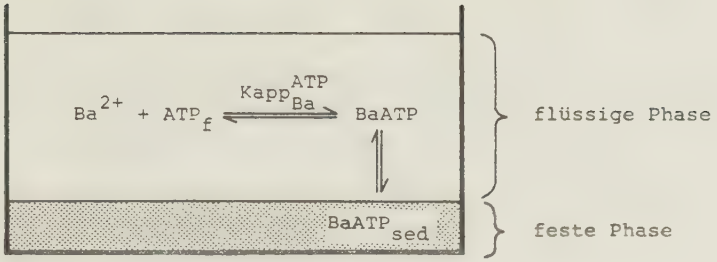
Diese apparente Bindungskonstante ist identisch mit der für die Herstellung der $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen benutzten apparenten Affinitätskonstanten von ATP für $Ba^{2+}$ (Tab. 2), die unter den gleichen ionalen Bedingungen experimentell bestimmt wurde (s. Kap. 2.3.2).

In der Reaktionsgleichung (A5) repräsentiert $[Ba^{2+}]$ die freie Ba-Konzentration, [BaATP] die Konzentration des BaATP-Komplexes und $[ATP_f]$ die Gesamtkonzentration des nicht mit $Ba^{2+}$ komplexierten ATP in der Lösung (Gl. (A1)-(A3)):

$$(A7) \quad [ATP_f] = [ATP^{4-}] + [HATP^{3-}] + [KATP^{3-}] + [NaATP^{3-}]$$

Durch die Gleichungen (A5)-(A7) ist die flüssige Phase der heterogenen Lösung charakterisiert.

Das heterogene System besteht aus einem Sediment (Bodenkörper) und einer gesättigten Lösung des schwerlöslichen Salzes BaATP (siehe Skizze auf der folgenden Seite). Zwischen dem festen Bodenkörper ($BaATP_{sed}$) und dem gelösten undissoziierten BaATP besteht ein Gleichgewicht, das durch die heterogene Grenzflächen-Reaktion $BaATP \rightleftharpoons BaATP_{sed}$ beschrieben wird. Das BaATP in der flüssigen Phase steht wiederum im Gleichgewicht mit $Ba^{2+}$ und $ATP_f$ (s. Gl. (A5)).




Da das chemische Potential ($\mu$) des festen Bodenkörpers konstant ist, ist auch das der gelösten Substanz bei gegebener Temperatur konstant (vgl. GLASSTONE, 1946). Das chemische Potential des gelösten undissoziierten BaATP ist gleich der Summe der chemischen Potentiale der dissoziierten Ionen:

$$(A8) \quad \mu_{BaATP} = \mu_{Ba^{2+}} + \mu_{ATP_f}$$

$$= \mu^{o}_{Ba^{2+}} + RT \cdot \ln a_{Ba^{2+}} + \mu^{o}_{ATP_f} + RT \cdot \ln a_{ATP_f}$$

Da die Standardpotentiale $\mu^{o}_{Ba^{2+}}$ und $\mu^{o}_{ATP_f}$ bei gegebener Temperatur konstant sind und $\mu_{BaATP}$ konstant ist, solange die Lösung gesättigt ist, folgt aus Gl. (A8) für die Aktivitäten der Ionen:

$$(A9) \quad a_{Ba^{2+}} \cdot a_{ATP_f} = \text{const}$$

Bei schwer löslichen Substanzen sind die Sättigungskonzentrationen so klein, daß anstelle der Ionen-Aktivitäten mit guter Näherung ihre Konzentrationen benutzt werden können:

$$(A10) \quad [Ba^{2+}] \cdot [ATP_f] = \text{const} = Lapp^{ATP}_{Ba} \quad ; \quad (T = \text{const})$$

Die Konstante $Lapp_{Ba}^{ATP}$, die nur von der Temperatur abhängig ist, stellt das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP für die aktuellen ionalen Bedingungen im Medium dar. Wird das Ionenprodukt $[Ba^{2+}] \cdot [ATP_f]$ in der gesättigten Lösung überschritten, so fällt solange ein BaATP-Niederschlag aus, bis das Ionenprodukt wieder gleich $Lapp_{Ba}^{ATP}$ ist. M.a.W., enthält eine BaATP-Lösung ein BaATP-Sediment, so ist die freie Ba-Konzentration der flüssigen Phase dieses heterogenen Systems nicht nur von der apparenten Affinitätskonstanten von ATP für $Ba^{2+}$, sondern auch von dem apparenten Löslichkeitsprodukt von BaATP unter den gegebenen ionalen Bedingungen abhängig. Im Gegensatz dazu wird die freie Ba-Konzentration einer homogenen BaATP-Lösung ($[Ba^{2+}] \cdot [ATP_f] \leqslant Lapp_{Ba}^{ATP}$) bei gegebenen Gesamtkonzentrationen an Ba und ATP allein von der Größe der apparenten Bindungskonstanten $Kapp_{Ba}^{ATP}$ bestimmt.

Die Konstante $Lapp_{Ba}^{ATP}$ läßt sich mit Hilfe einiger Erhaltungsgleichungen als Funktion experimentell relativ einfach ermittelbarer Parameter (s. Kap. 2.3.3 ) darstellen. Für die Gesamtkonzentration an gelöstem Ba ($[Ba_{gel}]$) und gelöstem ATP ($[ATP_{gel}]$) in der flüssigen Phase des heterogenen Systems gilt:

(A11) $[Ba_{gel}] = [Ba^{2+}] + [BaATP]$

(A12) $[ATP_{gel}] = [ATP_f] + [BaATP]$

Entsprechend gilt für die addierten Gesamtkonzentrationen an Ba ($[Ba_t]$) und ATP ($[ATP_t]$) im heterogenen System:

(A13) $[Ba_t] = [Ba_{gel}] + [BaATP_{sed}]$

(A14) $[ATP_t] = [ATP_{gel}] + [BaATP_{sed}]$

wobei $[BaATP_{sed}]$ die Konzentration des aus der Lösung ausgefallenen BaATP ist. Aus der Gl. (A 5) erhält man unter Verwendung der Gl. (A12) die Konzentration des BaATP-Komplexes

in der gesättigten Lösung:

$$(A15) \quad [BaATP] = [Ba^{2+}] \cdot [ATP_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP} \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1}$$

Setzt man die Gleichungen (A14) und (A15) in die Gl. (A11) ein, so ergibt sich für die Ba-Gesamtkonzentration in der flüssigen Phase:

$$(A16) \quad [Ba_{gel}] = [Ba^{2+}] + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP} \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} \cdot ([ATP_t] - [BaATP_{sed}])$$

$[ATP_t]$ kann bei der Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP vorgegeben werden und die Terme $[Ba_{gel}]$, $[BaATP_{sed}]$ und $Kapp_{Ba}^{ATP}$ dieser Gleichung lassen sich experimentell bestimmen (s. Kap. 2.3.2 und 2.3.3 ). Dadurch enthält die Gl. (A16) nur noch eine Unbekannte, die freie Ba-Konzentration $[Ba^{2+}]$ der flüssigen Phase. Die Lösung dieser quadratischen Gleichung für $[Ba^{2+}]$ lautet:

$$(A17) \quad [Ba^{2+}] = 1/2 \cdot ((((Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} + [ATP_t] - [BaATP_{sed}] - [Ba_{gel}])^2 + 4 \cdot [Ba_{gel}] \cdot (Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1})^{1/2} + [BaATP_{sed}] + [Ba_{gel}] - (Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} - [ATP_t])$$

Gibt man bei der experimentellen Bestimmung des apparenten BaATP-Löslichkeitsproduktes Ba und ATP in äquivalenten Konzentrationen vor ($[Ba_t] = [ATP_t]$), so läßt sich die Gl. (A17) mit Hilfe der Gleichungen (A13) und (A14) vereinfachen:

$$(A18) \quad [Ba^{2+}] = (2 \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} \cdot ((1 + 4 \cdot [Ba_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2} - 1)$$

Die Gesamtkonzentration an gelöstem ATP im Überstand erhält man, indem man die Gl. (A15) in die Gl. (A12) einsetzt:

$$(A19)\quad [ATP_{gel}] = [ATP_f] + [Ba^{2+}] \cdot [ATP_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP} \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1}$$

Daraus ergibt sich mit Hilfe der Gl. (A14) die Konzentration des freien, nicht mit $Ba^{2+}$ komplexierten ATP in der flüssigen Phase:

$$(A20)\quad [ATP_f] = ([ATP_t] - [BaATP_{sed}]) \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1}$$

Das Produkt aus Gl. (A17) und Gl. (A20) stellt nach Gl. (A10) das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP dar:

$$(A21)\quad Lapp_{Ba}^{ATP} = [Ba^{2+}] \cdot ([ATP_t] - [BaATP_{sed}]) \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1}$$

wobei $[Ba^{2+}]$ im allgemeinen Fall durch die Gl. (A17) gegeben ist. Werden die Randbedingungen bei der experimentellen Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP entsprechend gewählt (s.o.), so kann für $[Ba^{2+}]$ in Gl. (A21) die Gl. (A18) eingesetzt werden. Es resultiert dann:

$$(A22)\quad Lapp_{Ba}^{ATP} = (Kapp_{Ba}^{ATP})^{-1} \cdot ((1+4.[Ba_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2} - 1) \cdot ((1+4.[Ba_{gel}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP})^{1/2} + 1)^{-1} \cdot ([ATP_t] - [BaATP_{sed}])$$

Diese Gleichung, deren Terme experimentell bestimmbar sind, bildet die Grundlage für die im Kap. 2.3.3 dargestellte Methode zur Ermittlung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP. Die Kenntnis dieser Konstanten ermöglicht auch für Lösungen mit einem BaATP-Präzipitat quantitative Aussagen über die freie Ba-Konzentration. Darüber hinaus kann mit Hilfe des apparenten BaATP-Löslichkeitsproduktes die freie Ba-Konzen-

tration in heterogenen BaATP-Lösungen durch Veränderung des $[Ba_t]/[ATP_t]$-Verhältnisses (s. Kap. 5.2) kontrolliert variiert werden.

## 5.2 Anwendung von $Lapp_{Ba}^{ATP}$ bei der Zusammenstellung von $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen mit hohen freien Ba-Konzentrationen

Für eine Aktivierung der Myofibrillenbündel mit hohen $Ba^{2+}$-Konzentrationen ($[Ba^{2+}] > 0{,}7$ mM) wurden $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen vom Typ CE und CH benutzt (s. Kap. 2.3.1). Nach der im Kap. 2.3.1 verwendeten Terminologie ist die Konzentration $U_i$ eines Ba-Komplexes ($U_1$ = [BaEGTA], $U_2$ = [BaCP], $U_3$ = [BaATP], $U_4$ = [BaHDTA]) mit dem in der Konzentration $C_i$ vorliegenden Liganden $X_i$ ($X_1$,$C_1$ = EGTA; $X_2$,$C_2$ = CP; $X_3$,$C_3$ = ATP; $X_4$,$C_4$ = HDTA) in diesen Lösungen mit der freien Mg-Konzentration $[Mg^{2+}]$ gegeben durch:

$$(A23) \qquad U_i = C_i \cdot \alpha_{iBa} \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

$$(A24) \qquad \alpha_{iBa} = Kapp_{Ba}^{Xi} \cdot [Ba^{2+}]$$

$$(A25) \qquad \beta_i = Kapp_{Mg}^{Xi} \cdot [Mg^{2+}]$$

Darin sind $Kapp_{Ba}^{Xi}$ und $Kapp_{Mg}^{Xi}$ die apparenten Bindungskonstanten der Liganden für Ba- bzw. Mg-Ionen unter den vorliegenden ionalen Bedingungen (s. Kap. 2.3.2). Entsprechend gilt für die Konzentration $W_i$ eines Mg-Komplexes ($W_1$ = [MgEGTA], $W_2$ = [MgCP], $W_3$ = [MgATP], $W_4$ = [MgHDTA]) mit dem Liganden $X_i$ dieser Lösungen:

$$(A26) \qquad W_i = C_i \cdot \beta_i \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1}$$

Wird in diesen Lösungen das apparente Löslichkeitsprodukt von BaATP überschritten, so tritt eine BaATP-Präzipitation auf (s. Kap. 2.3.1), d.h. ein Teil des vorhandenen ATP

fällt aus der Lösung aus. Die dann bei einer gegebenen freien Mg-Konzentration zur Einstellung verschiedener freier Ba-Konzentrationen in den Lösungen CE und CH benötigten Ba- und Mg-Gesamtkonzentrationen ($\overline{Ba}_{CE}$, $\overline{Ba}_{CH}$, $\overline{Mg}_{CE}$, $\overline{Mg}_{CH}$) sind entsprechend der Zusammensetzung dieser Lösungen (Tab. 1, Kap. 2.3.1 ) gegeben durch:

$$(A27)\quad \overline{Ba}_{CE} = [Ba^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} U_i + [\overline{BaATP}] + [BaATP_{sed}]$$

$$(A28)\quad \overline{Ba}_{CH} = \overline{Ba}_{CE} - U_1 + U_4$$

$$(A29)\quad \overline{Mg}_{CE} = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} W_i + [\overline{MgATP}]$$

$$(A30)\quad \overline{Mg}_{CH} = \overline{Mg}_{CE} - W_1 + W_4$$

Darin ist $[\overline{MgATP}]$ die MgATP-Konzentration der betreffenden Lösung in Gegenwart eines BaATP-Präzipitates, $[\overline{BaATP}]$ die Konzentration des gelösten, undissoziierten BaATP-Komplexes und $[BaATP_{sed}]$ die Konzentration des aus der Lösung ausgefallenen BaATP.

In diesen präzipitathaltigen Lösungen sind, anders als im Reaktionsansatz zur Bestimmung des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP, auch Mg-Ionen vorhanden, die mit $Ba^{2+}$ um das freie ATP ($ATP_f$ aus Gl. (A7) in Kap. 5.1 ) konkurrieren:

$$(A31)\quad Ba^{2+} + ATP_f \overset{Kapp^{ATP}_{Ba}}{\rightleftharpoons} \overline{BaATP}$$

$$(A32)\quad Mg^{2+} + ATP_f \overset{Kapp^{ATP}_{Mg}}{\rightleftharpoons} \overline{MgATP}$$

Die in den präzipitathaltigen $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen vorliegende ATP-Gesamtkonzentration ($C_3$) ist damit

(A33) $C_3 = [ATP_f] + \overline{[MgATP]} + \overline{[BaATP]} + [BaATP_{sed}]$

Aus dieser Gleichung läßt sich mit Hilfe der Gl. (A31) und (A32) unter Verwendung des in Kap. 5.1 (Gl.(A10))definierten apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP ($Lapp_{Ba}^{ATP}$)die Konzentration des präzipitierten BaATP berechnen:

(A34) $Lapp_{Ba}^{ATP} = [Ba^{2+}] \cdot [ATP_f]$

(A35) $[BaATP_{sed}] = C_3 - Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot [Ba^{2+}]^{-1} \cdot (1 + [Ba^{2+}] \cdot Kapp_{Ba}^{ATP}$

$+ [Mg^{2+}] \cdot Kapp_{Mg}^{ATP})$

$= C_3 - Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot [Ba^{2+}]^{-1} \cdot (1 + \alpha_{3Ba} + \beta_3)$

Für die Konzentration an gelöstem und undissoziiertem BaATP und MgATP folgt aus Gl. (A31) und (A32) mit Hilfe der Gleichung für $Lapp_{Ba}^{ATP}$:

(A36) $\overline{[BaATP]} = Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot Kapp_{Ba}^{ATP}$

(A37) $\overline{[MgATP]} = [Mg^{2+}] \cdot Kapp_{Mg}^{ATP} \cdot Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot [Ba^{2+}]^{-1}$

$= \beta_3 \cdot Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot [Ba^{2+}]^{-1}$

Setzt man die Gl. (A35)-(A37) in die Gl. (A27)-(A30) ein, so erhält man die Ba- und Mg-Gesamtkonzentrationen für $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen mit einem BaATP-Präzipitat in Abhängigkeit von der freien Ba- und Mg-Konzentration:

$$(A38)\quad \overline{Ba}_{CE} = [Ba^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} C_i \cdot \alpha_{iBa} \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} - Lapp_{Ba}^{ATP} \cdot (1 + \beta_3) \cdot [Ba^{2+}]^{-1} + C_3$$

$$(A39)\quad \overline{Ba}_{CH} = \overline{Ba}_{CE} - C_1 \cdot \alpha_{1Ba} \cdot (1 + \alpha_{1Ba} + \beta_1)^{-1} + (1 + \alpha_{4Ba} + \beta_4)^{-1} \cdot C_4 \cdot \alpha_{4Ba}$$

$$(A40)\quad \overline{Mg}_{CE} = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^{2} C_i\beta_i \cdot (1 + \alpha_{iBa} + \beta_i)^{-1} + [Ba^{2+}]^{-1} \cdot \beta_3 \cdot Lapp_{Ba}^{ATP}$$

$$(A41)\quad \overline{Mg}_{CH} = \overline{Mg}_{CE} - C_1 \cdot \beta_1 \cdot (1 + \alpha_{1Ba} + \beta_1)^{-1} + (1 + \alpha_{4Ba} + \beta_4)^{-1} \cdot C_4 \cdot \beta_4$$

Diese Gleichungen wurden für die Zusammenstellung der BaATP-präzipitathaltigen $Ba^{2+}$-Aktivierungslösungen benutzt (s. Kap. 2.3.1 , Gl. (8) - (11)).
Wie man sieht, sind die freien Ba- und Mg-Konzentrationen dieser Lösungen von der Größe des apparenten Löslichkeitsproduktes von BaATP abhängig. Die Konstante $Lapp_{Ba}^{ATP}$ ist für die in den Badlösungen vorliegenden ionalen Bedingungen experimentell bestimmt worden (Kap. 2.3.3 ). Sie kann deshalb, sofern die Anwesenheit von $Mg^{2+}$ in den Badlösungen berücksichtigt wird (s.o.), ohne Korrektur für die Berechnung der Zusammensetzung der präzipitathaltigen Lösungen verwendet werden (vgl. Kap. 5.1 ).

## 5.3 Einige Betrachtungen zum Verlauf von Aktivierungskurven isolierter Myofibrillenbündel

In der Abb. 11 (Kap. 3.1.4) ist die typische Ca-Aktivierungskurve eines individuellen Myofibrillenbündels dargestellt, die durch einen Hill-Koeffizienten von n=4 charakterisiert werden kann und ihre halbmaximale isometrische steady-state-Spannung bei einem pCa $\approx$ 6,3 erreicht. Die Beziehung zwischen der relativen steady-state-Spannung und dem pCa in Gegenwart einer unterschwelligen freien Ba-Konzentration (Ca/Ba-Aktivierungskurve) desselben Präparates (Abb. 11, Kap. 3.1.4) wurde derart modifiziert, daß (1) die Steilheit der Ca/Ba-Aktivierungskurve kleiner wurde und (2) die relative $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung für pCa $\geq$ 6,3 größer und für pCa $\leq$ 6,3 kleiner war als die in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ entwickelte $Ca^{2+}$-induzierte Spannung. Nachfolgend wird gezeigt, daß dieser sowohl fördernde als auch hemmende Effekt von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-aktivierte steady-state-Spannung erklärt werden kann, wenn man annimmt, daß ein bestimmter, heterogen und vollständig mit Ca- und Ba-Ionen besetzter TN-Komplex der regulatorischen Untereinheit der funktionellen Einheit des Kontraktionsmechanismus nicht zur Kraftentwicklung führt, während alle übrigen heterogen oder homogen mit Ca- und Ba-Ionen abgesättigten TN-Komplexe zur Kraftentwicklung beitragen.

Die $Ca^{2+}$-sensitive Untereinheit (TN-C) der regulatorischen Einheit (TN-Komplex) des kontraktilen Mechanismus besitzt 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen (s. Kap. 1.3). Aus der Steilheit der Ca-Aktivierungskurven der Myofibrillenbündel (Hill-Koeffizient n=4) geht hervor, daß die Bindung von Ca-Ionen an alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit eine Voraussetzung für die Kraftentwicklung in vivo ist. Repräsentiert R die $Ca^{2+}$-sensitive Untereinheit des Regulationsmechanismus der Kontraktion, so ist demnach die entwickelte steady-state-Spannung (P) proportional zur Konzentration der mit $Ca^{2+}$ gesättigten Einheiten ($Ca_4R$) und erreicht das Maximum ($P_{max}$), wenn alle regulatorischen Einheiten ($R_t$) je 4 Ca-Ionen gebunden haben:

(A42) $P \propto [Ca_4R]$ ; $P = P_{max}$, wenn $[Ca_4R] = [R_t]$

Für die relative $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung ($P_{Ca}$) gilt dann :

(A43) $P_{Ca} = P \cdot P_{max}^{-1} = [Ca_4R] \cdot [R_t]^{-1}$

Untersuchungen der Kinetik der Spannungsentwicklung enthäuteter schneller Skelettmuskelfasern (MOISESCU, 1976; STEPHENSON & WILLIAMS, 1981) haben ergeben, daß sich die Ca-Ionen nach einem konsekutiven Reaktionsschema (vgl. ASHLEY & MOISESCU, 1977) an die regulatorische Einheit binden:

(A44) $Ca^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} CaR + Ca^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ca_2R + Ca^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ca_3R + Ca^{2+} \overset{K_4}{\rightleftharpoons} Ca_4R \propto P$

Darin sind $K_1$, $K_2$, $K_3$ und $K_4$ die apparenten Gleichgewichtskonstanten der vier $Ca^{2+}$-Bindungsreaktionen. Aus diesem Schema kann unter der Annahme, daß die Anzahl der die Spannung kontrollierenden $Ca^{2+}$-regulierten regulatorischen Einheiten bei einer gegebenen Sarcomerlänge konstant ist ($[R_t]$ = const), die Beziehung für die relative isometrische Spannung unter Verwendung der Erhaltungsgleichung für $R_t$ nach Gl. (A43) abgeleitet werden:

(A45) $[R_t] = [R] + [CaR] + [Ca_2R] + [Ca_3R] + [Ca_4R] = \text{const}$

(A46) $P_{Ca} = K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4 \cdot (1+K_1[Ca^{2+}] + K_1K_2[Ca^{2+}]^2 + K_1K_2K_3[Ca^{2+}]^3 + K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4)^{-1}$

Das obige konsekutive Schema (A44) ergibt die steilste sigmoide Kurve für $P_{Ca}$ (Gl. (A47)), wenn $K_1$, $K_2$, $K_3 \ll K_4$, weil dann die regulatorischen Einheiten praktisch nur in der Form R und $Ca_4R$ vorliegen:

(A47) $P_{Ca} = [Ca_4R] \cdot ([R] + [Ca_4R])^{-1} = K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4 \cdot (1+K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4)^{-1}$

Diese Gleichung beschreibt in guter Näherung die gemessene relative isometrische Spannung in Abhängigkeit von der freien Ca-Konzentration (Abb. 11, Kap. 3.1.4), wenn das Produkt $K_1K_2K_3K_4$ den Wert $2 \cdot 10^{25}$ $M^{-4}$ annimmt.

Ba-Aktivierungskurven individueller Myofibrillenbündel zeichnen sich besonders durch ihre deutlich geringere Steilheit als die entsprechender Ca-Aktivierungskurven aus (s. Kap. 3.1.1). Nimmt man an, daß sich trotz des Hill-Koeffizienten von n=2, der ja nur die Mindestzahl der am Prozeß der Spannungsentwicklung beteiligten Ionen angibt (s. Kap. 1.4; vgl. auch MOISESCU, ASHLEY & CAMPBELL, 1975), die Ba-Ionen an dieselben Bindungsstellen der regulatorischen Einheit binden wie die Ca-Ionen, so ergibt sich folgendes Reaktionsschema:

$$\text{(A48)}\quad Ba^{2+} + R \overset{K_1'}{\rightleftharpoons} BaR + Ba^{2+} \overset{K_2'}{\rightleftharpoons} Ba_2R + Ba^{2+} \overset{K_3'}{\rightleftharpoons} Ba_3R + Ba^{2+} \overset{K_4'}{\rightleftharpoons} Ba_4R \quad \propto \quad P$$

Unter der Annahme, daß wie im Falle der $Ca^{2+}$-Aktivierung die funktionelle Einheit des Kontraktionsmechanismus nur dann Kraft entwickeln kann, wenn alle 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit mit $Ba^{2+}$ besetzt sind, folgt für die relative $Ba^{2+}$-induzierte Spannung entsprechend Gl. (A46):

$$\text{(A49)}\quad P_{Ba} = K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4 \cdot (1 + K_1'[Ba^{2+}] + K_1'K_2'[Ba^{2+}]^2 + K_1'K_2'K_3'[Ba^{2+}]^3 + K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4)^{-1}$$

Dividiert man Zähler und Nenner dieser Gleichung durch $\beta = K_1'K_2' \cdot [Ba^{2+}]^2$, so erhält man:

$$\text{(A50)}\quad P_{Ba} = K_3'K_4'[Ba^{2+}]^2 \cdot ((1+K_1'[Ba^{2+}])\beta^{-1} + 1 + K_3'[Ba^{2+}] + K_3'K_4'[Ba^{2+}]^2)^{-1}$$

Bei dieser Schreibweise der Gl. (A49) erkennt man, daß sie sigmoide Ba-Aktivierungskurven mit der beobachteten Steilheit (n=2) beschreibt, wenn für die apparenten Gleichgewichtskonstanten der $Ba^{2+}$-Bindungsreaktionen folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

$$\text{(A51)}\qquad K_1' \ll K_2' \;; \qquad K_1'K_2'[Ba^{2+}]^2 \gg 10, \text{ wenn } K_3'K_4'[Ba^{2+}]^2 < 0{,}01$$

In diesem Falle ist die Gesamtkonzentration der regulatorischen Einheiten in guter Näherung durch die Summe der folgenden Reaktionsprodukte gegeben:

(A52) $[R_t] \approx [R] + [Ba_2R] + [Ba_4R]$

Die in der Abb. 8 (Kap. 3.1.1) dargestellte individuelle Ba-Aktivierungskurve, die auf einer Kraftentwicklung infolge der konsekutiven Reaktion von 2 Ba-Ionen mit den apparenten Gleichgewichtskonstanten $K_1 = 70\ M^{-1}$ und $K_2 = 3{,}5 \cdot 10^4\ M^{-1}$ beruht, kann auch exakt durch das Reaktionsschema (A48) beschrieben werden, wenn dessen Gleichgewichtskonstanten entsprechend den Bedingungen (A51) gewählt werden: $K_1' \geqslant 10^4\ M^{-1}$, $K_2' \geqslant 10^6\ M^{-1}$, $K_3' = K_1$, $K_4' = K_2$. Diese Werte deuten an, daß, wenn alle $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit an der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion beteiligt sind, 2 $Ca^{2+}$-Bindungsplätze eine sehr hohe Affinität für Ba-Ionen besitzen, die entwickelte steady-state-Spannung jedoch i.W. durch die Bindung der letzten beiden Ba-Ionen bestimmt wird.

Diese Interpretation böte auch eine Erklärungsmöglichkeit für den Befund, daß sich die Steilheit der Ca-Aktivierungskurve in Gegenwart einer unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M (Ca/Ba-Aktivierungskurve) verringert (Abb. 11, Kap. 3.1.4). Sie kann jedoch nicht das Ergebnis erklären, daß die Ca/Ba-Aktivierungskurve die "reine" Ca-Aktivierungskurve desselben Präparates schneidet. Wenn nämlich aufgrund ihrer hohen Affinität für $Ba^{2+}$ ein Teil der $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheiten bei einer geringen freien Ba-Konzentration schon besetzt sind, so sollte, wenn die Bindung von $Ba^{2+}$ einen kontraktionsfördernden Effekt hat, die Ca/Ba-Aktivierungskurve bei derselben submaximalen $Ca^{2+}$-Konzentration stets einen höheren Wert als die reine Ca-Aktivierungskurve besitzen (s. Abb. 30). Wenn andererseits die Bindung von Ba-Ionen an die regulatorischen Einheiten einen kontraktionshemmenden Effekt hat, würde man aus demselben Grunde erwarten, daß die Ca/Ba-Aktivierungskurve stets unterhalb der Ca-Aktivierungskurve verläuft (Abb. 30). Man kann das Phänomen des

Schneidens dieser beiden Aktivierungskurven erklären, wenn man annimmt, daß eine der vollständig und heterogen besetzten regulatorischen Einheiten nicht zur Kraftentwicklung beiträgt. Neben den Reaktionen (A44) und (A48) mögen noch die folgenden zwei heterogenen konsekutiven Reaktionsschemata die Kraftentwicklung des Kontraktionsmechanismus in Anwesenheit von Ca- und Ba-Ionen bestimmen:

(A53)

$$Ba^{2+} + R \overset{K_1'}{\rightleftharpoons} BaR + Ba^{2+} \overset{K_2'}{\rightleftharpoons} Ba_2R + Ba^{2+} \overset{K_3'}{\rightleftharpoons} Ba_3R + Ca^{2+} \overset{K_{BaCa}}{\rightleftharpoons} Ba_3CaR \quad \propto \quad P$$

(A54)

$$Ca^{2+} + R \overset{K_1}{\rightleftharpoons} CaR + Ca^{2+} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Ca_2R + Ca^{2+} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Ca_3R + Ba^{2+} \overset{K_{CaBa}}{\rightleftharpoons} Ca_3BaR^*$$

Das mit einem Stern gekennzeichnete Reaktionsendprodukt ($Ca_3BaR^*$) führe dabei nicht zu einer Kontraktion, während die anderen mit 4 Ionen besetzten regulatorischen Einheiten ($Ca_4R$, $Ba_4R$, $Ba_3CaR$) eine Kraftentwicklung der funktionellen Einheit verursachen. Die relative isometrische Spannung in Gegenwart von Ca- und Ba-Ionen ($P_{Ca,Ba}$) ist dann analog zu Gl. (A43):

$$(A55) \quad P_{Ca,Ba} = ([Ca_4R] + [Ba_4R] + [Ba_3CaR]) \cdot ([R] + [R_{Ca}] + [R_{Ba}] + [Ba_3CaR] + [Ca_3BaR^*])^{-1}$$

Darin repräsentiert $[R_{Ca}]$ die Gesamtkonzentration der homogen mit Ca-Ionen besetzten und $[R_{Ba}]$ die Gesamtkonzentration der homogen mit Ba-Ionen besetzten intermediären Reaktionsprodukte der Schemata (A44), (A48), (A53) und (A54). Aufgrund der experimentellen Ergebnisse der steady-state Aktivierung mit Ca- und Ba-Ionen (s.o.) kann man in guter Näherung für diese Gesamtkonzentrationen schreiben (s. Gl. (A47) und (A52)):

$$(A56) \quad [R_{Ca}] \approx [Ca_4R]$$

$$(A57) \quad [R_{Ba}] \approx [Ba_2R] + [Ba_4R]$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen folgt aus Gl. (A55) für die relative isometrische Spannung in Gegenwart von Ca- und Ba-Ionen:

$$(A58)\quad P_{Ca,Ba} = (K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1} + K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1} + K_1'K_2'K_3'[Ba^{2+}]^3 \cdot K_{BaCa} \cdot \alpha^{-1} \cdot [Ca^{2+}]) \cdot (1 + K_1K_2K_3K_4[Ca^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1} + K_1K_2K_3[Ba^{2+}]K_{CaBa} \cdot \alpha^{-1} \cdot [Ca^{2+}]^3 + K_1'K_2'K_3' \cdot [Ba^{2+}]^3 \cdot K_{BaCa} \cdot \alpha^{-1} \cdot [Ca^{2+}])^{-1}$$

$$(A59)\quad \alpha = 1 + K_1'K_2'[Ba^{2+}]^2 + K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4$$

Bei der experimentellen Untersuchung der Wirkung von $Ba^{2+}$ auf die $Ca^{2+}$-induzierte steady-state-Spannung (Kap. 3.1.4) war $[Ba^{2+}] = 5 \cdot 10^{-5}$ M = const gewählt worden, so daß $\alpha$ = const ist. Bei dieser freien Ba-Konzentration entwickelt sich noch keine $Ba^{2+}$-abhängige Spannung (s. Kap. 3.1.1), so daß der Term $K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1}$, der die relative $Ba^{2+}$-induzierte Spannung unter der Bedingung (A51) beschreibt (s.o.), gleich null gesetzt werden kann. Es folgt dann aus Gl. (A58) für die relative $Ca^{2+}$-induzierte Spannung in Gegenwart einer unterschwelligen konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration:

$$(A60)\quad P_{Ca,Ba} = (A[Ca^{2+}]^4 + C[Ca^{2+}]) \cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}])^{-1}$$

$$(A61)\quad A = K_1K_2K_3K_4 \cdot \alpha^{-1}$$

$$(A62)\quad B = K_1K_2K_3K_{CaBa} \cdot [Ba^{2+}] \cdot \alpha^{-1}$$

$$(A63)\quad C = K_1'K_2'K_3'K_{BaCa} \cdot [Ba^{2+}]^3 \cdot \alpha^{-1}$$

Aus den experimentell ermittelten steady-state-Spannungen $P^i_{Ca,Ba}$ (s. Abb. 11, Kap. 3.1.4; $P^1_{Ca,Ba} = 0{,}19$; $P^2_{Ca,Ba} = 0{,}37$; $P^3_{Ca,Ba} = 0{,}62$) für die freien Ca-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_1 = 2{,}5 \cdot 10^{-7}$ M; $[Ca^{2+}]_2 = 3{,}9 \cdot 10^{-7}$ M; $[Ca^{2+}]_3 = 6{,}46 \cdot 10^{-7}$ M) läßt sich das folgende Gleichungssystem formulieren, aus dem die unbekannten Konstanten der Gl. (A60) einfach berechnet werden können:

$$P^1_{Ca,Ba} = (A[Ca^{2+}]_1^4 + C[Ca^{2+}]_1) \cdot (1+A[Ca^{2+}]_1^4 + B[Ca^{2+}]_1^3 + C[Ca^{2+}]_1)^{-1}$$

$$P^2_{Ca,Ba} = (A[Ca^{2+}]_2^4 + C[Ca^{2+}]_2) \cdot (1+A[Ca^{2+}]_2^4 + B[Ca^{2+}]_2^3 + C[Ca^{2+}]_2)^{-1}$$

$$P^3_{Ca,Ba} = (A[Ca^{2+}]_3^4 + C[Ca^{2+}]_3) \cdot (1+A[Ca^{2+}]_3^4 + B[Ca^{2+}]_3^3 + C[Ca^{2+}]_3)^{-1}$$

Für die Konstanten ergeben sich daraus die Werte

$$A = 2 \cdot 10^{25}\ M^{-4}$$

$$B = 5 \cdot 10^{18}\ M^{-3}$$

$$C = 7 \cdot 10^{5}\ M^{-1}$$

Mit diesen Konstanten sind die Ca/Ba-Aktivierungskurven in Abb. 11 (Kap. 3.1.4) und Abb. 30 (Kurve 1) nach Gl. (A60) berechnet worden. Dieselbe Gleichung beschreibt die Ca-Aktivierungskurve in Abwesenheit von $Ba^{2+}$ desselben Kontraktionsmechanismus, wenn in Gl. (A59) - (A63) für $[Ba^{2+}] = 0$ gesetzt wird. Es resultiert dann:

(A64) $$P_{Ca,Ba=0} = P_{Ca} = A[Ca^{2+}]^4 \cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4)^{-1}$$

Die reinen Ca-Aktivierungskurven in Abb. 11 (Kap. 3.1.4) und Abb. 30 (Kurve 2) sind nach dieser Gleichung berechnet worden. Wie man sieht, kann die Modellvorstellung, daß ein bestimmtes, vollständig und heterogen mit 1 Ba- und 3 Ca-Ionen besetztes Reaktionsprodukt nicht zur Kontraktion der funktionellen Einheit führt, das Schneiden der Ca/Ba-Aktivierungskurve mit der reinen Ca-Aktivierungskurve bei einer relativen Spannung von ca. 40-50 % $P_{max}$ erklären.

In der Abb. 30 ist zusätzlich der mit denselben Konstanten berechnete Verlauf der Ca/Ba-Aktivierungskurve eingezeichnet worden unter der Annahme, daß

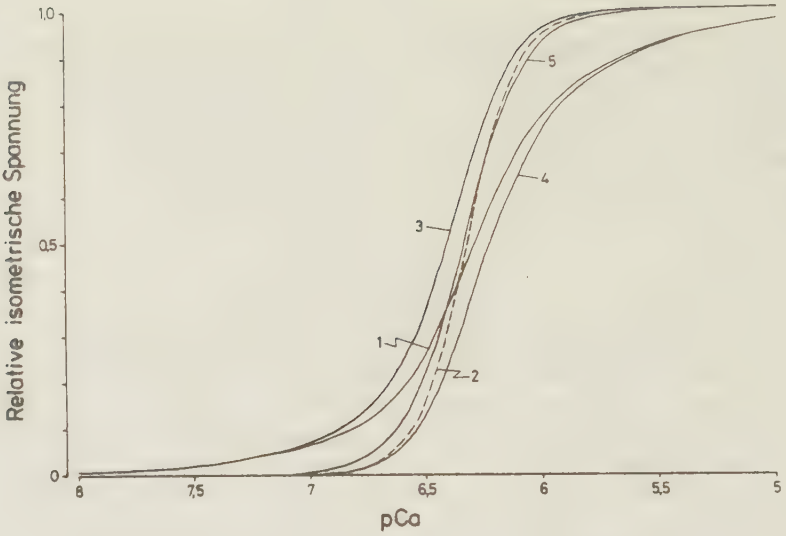



Abb. 30
Ca-Aktivierungskurve in Ab- und Anwesenheit von $5 \cdot 10^{-5}$ M $Ba^{2+}$

Der Spannungsentwicklung sind folgende Reaktionsschemata der regulatorischen Untereinheit der funktionellen kontraktilen Einheit (R) für die Bindung von Ca- und Ba-Ionen zugrunde gelegt:

$Ca^{2+} + R \rightleftharpoons CaR + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_2R + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_3R + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_4R$

$Ba^{2+} + R \rightleftharpoons BaR + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ba_2R + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ba_3R + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ba_4R$

$Ba^{2+} + R \rightleftharpoons BaR + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ba_2R + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ba_3R + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ba_3CaR$

$Ca^{2+} + R \rightleftharpoons CaR + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_2R + Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_3R + Ba^{2+} \rightleftharpoons Ca_3BaR$

Die Aktivierungskurven 1-5 wurden aus diesen Schemata abgeleitet, unter der Annahme, daß die Spannungsentwicklung (P) proportional zu den folgenden Reaktionsprodukten ist (s. Text):

Kurve 1 : $P \propto (Ca_4R + Ba_4R + Ba_3CaR)$

2 : $P \propto Ca_4R$; $[Ba^{2+}] = 0$ (reine Ca-Aktivierungskurve)

3 : $P \propto (Ca_4R + Ba_4R + Ba_3CaR + Ca_3BaR)$

4 : $P \propto Ca_4R$

5 : $P \propto (Ca_4R + Ba_4R + Ca_3BaR)$

(1) alle Endprodukte der Reaktionsschemata (A44), (A48), (A53) und (A54) eine Kontraktion zur Folge haben (Kurve 3; $Ba^{2+}$ wirkt ausschließlich kontraktionsfördernd),

(2) alle Endprodukte, die ein oder mehrere Ba-Ionen gebunden haben, keine Kontraktion verursachen (Kurve 4; $Ba^{2+}$ wirkt ausschließlich kontraktionshemmend),

(3) nur das zweite heterogene Endprodukt, $Ba_3CaR$, nicht zur Kraftentwicklung beiträgt (Kurve 5).

Im Falle (1) und (2) tritt ein Schneiden der jeweiligen Ca/Ba-Aktivierungskurve mit der reinen Ca-Aktivierungskurve nicht auf. Dagegen wird im Fall (3) ein Schnittpunkt dieser Kurven bei etwa 70 % der maximalen isometrischen Spannung erwartet. Die Steilheit dieser sigmoiden Kurve ist jedoch so groß, daß sie die experimentellen Daten nicht beschreiben kann. Allein die sigmoide Kurve, die resultiert, wenn nur das Endprodukt $Ca_3BaR$ nicht zur Spannungsentwicklung beiträgt, beschreibt die experimentellen Ergebnisse in guter Näherung (s. Abb. 11, Kap. 3.1.4).

Der Spannungsentwicklung der funktionellen kontraktilen Einheit in Anwesenheit von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ geht eine Bindung dieser Ionen an die regulatorische Einheit nach den Reaktionsschemata (A44), (A48), (A53) und (A54) voraus. Bei einer bestimmten freien Konzentration ist die an die $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheiten gebundene relative Gesamtmenge an Ca- und Ba-Ionen, $(Ca+Ba)_b$, gegeben durch:

$$(A65) \quad (Ca+Ba)_b = \left(\sum_{i=1}^{4} i \cdot [R^i_{Ca,Ba}]\right) \cdot (4 \cdot [R_t])^{-1}$$

Darin repräsentiert $[R^i_{Ca,Ba}]$ die Gesamtkonzentration der regulatorischen Einheiten, die insgesamt i (1,...,4) Ca- und Ba-Ionen pro Einheit gebunden haben, und der Nenner stellt die Ionenmenge dar, die maximal bei 4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen pro regulatorischer Einheit vom Regulationsmechanismus gebunden werden kann. Aus den Reaktionsschemata für die Bindung von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ (s.o.) folgt dann:

$$(A66)\quad (Ca+Ba)_b = (4\cdot([Ca_4R] + [Ba_4R] + [Ba_3CaR] + [Ca_3BaR^*]) + 2\cdot[Ba_2R]) \cdot \frac{1}{4}$$
$$\cdot ([Ca_4R] + [Ba_4R] + [Ba_2R] + [Ba_3CaR] + [Ca_3BaR^*] + [R])^{-1}$$

Mit Hilfe der Gl. (A59) ergibt sich daraus für die relative Bindung von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$ an den Regulationsmechanismus :

$$(A67)\quad (Ca+Ba)_b = (A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}] + K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1}$$
$$+ 0{,}5 \cdot K_1'K_2'[Ba^{2+}]^2 \cdot \alpha^{-1}$$
$$\cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}])^{-1}$$

Bei einer konstanten $Ba^{2+}$-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M nimmt der Summand $K_1'K_2'K_3'K_4'[Ba^{2+}]^4 \cdot \alpha^{-1}$ den Wert null an (s.o.), und der Faktor $K_1'K_2'[Ba^{2+}]^2 \cdot \alpha^{-1}$ ist praktisch gleich eins (s. Gl. (A51)). Für die von den $Ca^{2+}$-Bindungsstellen der regulatorischen Einheit gebundene relative Gesamtmenge an Ca- und Ba-Ionen als Funktion der freien Ca-Konzentration folgt dann aus Gl. (A67):

$$(A68)\quad (Ca+Ba)_b = 1 - 0{,}5 \cdot (1 + A[Ca^{2+}]^4 + B[Ca^{2+}]^3 + C[Ca^{2+}])^{-1}$$

Diese Gleichung beschreibt die Ca/Ba-Bindungskurve, die zusammen mit den Ca-Aktivierungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von $Ba^{2+}$ in Abb. 11 (Kap. 3.1.4) eingezeichnet ist.

## 6. Z U S A M M E N F A S S U N G

(1) Die enthäutete Skelettmuskelfaser bietet die Möglichkeit, zwei funktionelle Systeme der Muskelzelle, das kontraktile System (KS) und das Sarcoplasmatische Reticulum (SR) mit Hilfe geeigneter "intrazellulärer" Lösungen direkt zu untersuchen. An diesem Präparat wurden Aktivierungsexperimente am KS mit Ca-, Sr-, Ba- und Cd-Ionen und Experimente zur $Ca^{2+}$- und Coffein-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR und zur $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Aufnahme ins SR durchgeführt. Dabei diente stets die Änderung der mechanischen Spannung des KS als Meßsignal.

(2) Das KS der enthäuteten Skelettmuskelfaser ist außer durch $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ auch durch $Ba^{2+}$ und $Cd^{2+}$ aktivierbar. Alle diese Kationen können die maximale isometrische Spannung auslösen. Das Verhältnis der Empfindlichkeiten des KS für die kontraktionsaktivierenden Kationen $Ca^{2+}$: $Cd^{2+}$: $Sr^{2+}$: $Ba^{2+}$ beträgt etwa 1000 : 130 : 28 : 1. Die Empfindlichkeit ist umso größer, je mehr sich das divalente Kation der Größe von $Ca^{2+}$ nähert.

(3) Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der steady-state-Aktivierung und der Kinetik der $Ba^{2+}$-induzierten Kontraktion deuten darauf hin, daß der Reaktionsmechanismus des KS in Gegenwart von $Ba^{2+}$ im Vergleich zu $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ verändert ist. Die Ba-Aktivierungskurve ließ sich mit einem Hill-Koeffizienten (n) von 2 beschreiben, während die Ca- und die Sr-Aktivierungskurve durch n = 4 charakterisiert war.

(4) Der Zeitverlauf der $Ba^{2+}$-induzierten Spannungsentwicklung konnte in dem Konzentrationsbereich pBa 4,00 - 3,15 unter Annahme eines konsekutiven Reaktionsschemas mit 2 $Ba^{2+}$-abhängigen Reaktionsschritten für den Prozeß der Kraftentwicklung rekonstruiert werden. Die Geschwindigkeitskonstante der Relaxation (2,3 $s^{-1}$) des $Ba^{2+}$-aktivierten KS ist der Relaxationsrate der intakten Skelettmuskelfaser in vivo sehr ähnlich.

(5) Eine Erhöhung der freien Mg-Konzentration von 1mM auf 3mM führte zu einer kompetitiven Hemmung der $Ba^{2+}$-induzierten steady-state-Spannung. Dieser Befund spricht für eine regulatorische Funktion der $Mg^{2+}$-sensitiven $Ca^{2+}$-Bindungsstellen des TN-C bei der Muskelkontraktion.

(6) Der Hill-Koeffizient der Ca- Aktivierungskurve wurde in Gegenwart einer unterschwelligen $Ba^{2+}$-Konzentration ($5 \cdot 10^{-5}$M) von 4 auf 2 erniedrigt, ohne daß sich dabei die Lage der Kurve auf der pCa-Achse wesentlich änderte. Dieser Befund ist gleichwertig mit einer Förderung der $Ca^{2+}$-induzierten steady-state-Kraft für pCa $\gtrsim$ 6,3 und einer Hemmung der $Ca^{2+}$-induzierten Kontraktion für pCa $\lesssim$ 6,3 in Gegenwart von $Ba^{2+}$. Es wird ein Reaktionsmodell des KS vorgestellt, das diese $Ba^{2+}$-induzierte Veränderung der Ca-Aktivierungskurve beschreiben kann und die veränderte Stöchiometrie der $Ba^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung verständlich macht.

(7) Eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR der enthäuteten Muskelfaser konnte in Gegenwart einer physiologischen $Mg^{2+}$-Konzentration (1mM) unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden. Bereits Ca-Konzentrationen zwischen $4 \cdot 10^{-7}$ - $10^{-6}$ M konnten eine graduierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem annähernd physiologisch mit $Ca^{2+}$beladenen SR auslösen. Eine erhöhte $Ca^{2+}$-Beladung des SR hatte eine verstärkte $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung zur Folge. Die Existenz eines Membranpotentials des rudimentären T-Systems der enthäuteten Faser war nicht essentiell für das Auftreten dieses Prozesses.

(8) Unter Bedingungen, die die $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR erleichtern, wurde eine Förderung der Coffein-Wirkung auf das annähernd physiologisch mit $Ca^{2+}$ beladene SR durch $SCN^-$ festgestellt. Die Befunde sind aus der heutigen Vorstellung über die Wirkungsmechanismen dieser Substanzen über eine Kontrolle der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem SR durch den T-SR-Kopplungsmechanismus erklärbar. An der Kontrolle ist wahrscheinlich ein "$SCN^-$-sensitives" Element in diesem Mechanismus

beteiligt.

(9) Die Wirkung von Coffein auf das SR konnte mit dem von STEPHENSON (1979) vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus erklärt werden. Eine vergleichende Untersuchung der Wirkung verschiedener Coffein-ähnlicher Methylxanthine auf das SR ergab, daß für die Vermittlung der "Coffein-artigen" Wirkung die Doppelbindung am Stickstoff in 9-Position des Purinringes wichtig ist. Eine Wirkung der Methylxanthine über die Hemmung einer Phosphodiesterase konnte aufgrund weiterer Experimente ausgeschlossen werden.

(10) Über eine quantitative Untersuchung von Coffein-induzierten Spannungstransienten im Anschluß an kontrollierte $Ca^{2+}$- und $Sr^{2+}$-Ladungsschritte des SR konnte mit Hilfe eines Modells die Speicherkapazität des SR in situ für $Ca^{2+}$ und $Sr^{2+}$ bestimmt werden. Sie liegt für $Ca^{2+}$ im Bereich zwischen 58 - 73 mM und ist für $Sr^{2+}$ etwa um den Faktor 1,6 kleiner. Die $Ca^{2+}$-Aufnahmerate ins SR hatte ein Optimum bei pH 7 - 7,2.

## 7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADELSTEIN, R.S. & EISENBERG, E. (1980): Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. Ann. Rev. Biochem. 49, 921 - 956

ASHLEY, C. C. & MOISESCU, D. G. (1972): Model for the action of calcium in muscle. Nature 237, 208 - 211

ASHLEY, C. C. & MOISESCU, D. G. (1974): The influence of $Mg^{2+}$ concentration and of pH upon the relationship between steady-state isometric tension and $Ca^{2+}$ concentration in isolated bundles of barnacle myofibrils. J. Physiol. 239, 112 - 114 P

ASHLEY, C. C. & MOISESCU, D. G. (1977): Effect of changing the composition of the bathing solutions upon the isometric tension-pCa relationship in bundles of crustacean myofibrils. J. Physiol. 270, 627 - 652

BÁRÁNY, K., BÁRÁNY, M., GILLIS, J. M. & KUSHMERICK, M. J. (1979): Phosphorylation-dephosphorylation of the 18,ooo-dalton light chain of myosin during the contraction-relaxation cycle of frog muscle. J. Biol. Chem. 254, 3617 - 3623

BASTIAN, J. & S. NAKAJIMA (1974): Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 63, 257 - 278

BAYLOR, S. M. & OETLIKER, H. (1975): Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum. Nature 253, 97 - 101

BEAVO, J.A., ROGERS, N.L., CROFFORD, O.B., BAIRD, C.E., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. & NEWMAN, E.V. (1971): Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and lipolysis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 129 - 136

BEELER, T. J. (1980): $Ca^{2+}$ uptake and membrane potential in sarcoplasmic reticulum vesicles.J. Biol. Chem. 255, 9156 - 9161

BERSON, G. (1974): $Ca^{2+}$, $Sr^{2+}$ and $Ba^{2+}$ sensitivity of tropomyosin-troponin complex from cardiac and fast skeletal muscles. In: Calcium Binding Proteins (Eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska & E. Carafoli). Elsevier, Amsterdam. pp 197 - 201

BEST, P. M. & FORD, L. E. (1978): Calcium release and membrane voltage changes within muscle cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 307, 640 - 641

BEZANILLA, F. & HOROWICZ, P. (1975): Fluorescence intensity changes associated with contractile activation in frog muscle stained with Nile Blue A. J. Physiol. 246, 709-735

BLINKS, J. R., MATTINGLY, P.H., JEWELL, B. R., VAN LEEUWEN, M., HARRER, G. C. & ALLEN, D. G. (1978): Practical aspects of the use of aequorin as a calcium indicator: assay, preparation, microinjection, and interpretation of signals. In: Methods in Enzymology Vol. 57 (Ed. M. A. De Luca). Academic Press, New York, pp 292 - 328

BLINKS, J. R., PRENDERGAST, F. G. & ALLEN, D. G. (1976): Photoproteins as biological calcium indicators. Pharmac. Rev. 28, 1 - 93

BLINKS, J. R., RÜDEL, R. & TAYLOR, S. R. (1978): Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. J. Physiol. 277, 291-323

BOREJDO, J. & OPLATKA, A. (1976): Tension development in skinned glycerinated rabbit psoas fiber segments irrigated with soluble myosin fragments. Biochim. Biophys. Acta 440, 241 - 258

BRANDT, P.W., COX, R.N. & KAWAI, M. (1980): Can the binding of $Ca^{2+}$ to two regulatory sites on troponin C determine the steep pCa/tension relationship of skeletal muscle? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4717 - 4720

BRANDT, P.W., REUBEN, J.P. & GRUNDFEST, H. (1972): Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. J. Gen. Physiol. 59, 305 - 317

BREMEL, R. D., MURRAY, J. M., WEBER, A. (1973): Manifestations of cooperative behaviour in the regulated actin filament during actin activated ATP hydrolysis in the presence of calcium. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 267 - 275

BREMEL, R. D. & WEBER, A. (1972): Cooperation within activ filament in vertebrate skeletal muscle. Nature 238, 97 - 101

CALDWELL, P. C. & WALSTER, G. E. (1963): Studies on the microinjection of various substances into crab muscle fibres. J. Physiol. 169, 353 - 372

CAMPBELL, K. P., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & SHAMOO, A. E. (1980): Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the 'sarcoplasmic feet' associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta 602, 97-116

CAMPBELL, K. P. & SHAMOO, A. E. (1980): Chloride-induced release of actively loaded Calcium from light and heavy sarcoplasmic reticulum. J. Membr. Biol. 54, 73 - 80

CAPUTO, C. (1972): The time course of potassium contractures of single muscle fibres. J. Physiol. 223, 483 - 505

CAPUTO, C., GOTTSCHALK, G. & LÜTTGAU, H. C. (1981): The control of contraction activation by the membrane potential. Experienta 37, 580 - 581

CARDINI, C. E. & LELOIR, L. F. (1957): General procedure for isolating and analyzing tissue organic phosphates. In: Methods in Enzymology, Vol. 3 (Eds. S. P. Colowick & N. O. Kaplan). Academic Press Inc., New York, pp 835 - 840

CARSLAW, H.S. & JAEGER, J.C. (1959): Conduction of Heat in Solids. 2nd Edn. Clarendon Press, Oxford

CARVALHO, A. P. (1966): Binding of cations by microsomes from rabbit skeletal muscle. J. Cellular Physiol. 67, 73 - 84

CARVALHO, A. P. & LEO, B. (1967): Effects of ATP on the interaction of $Ca^{++}$, $Mg^{++}$, and $K^{+}$ with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 50, 1327 - 1352

CHANDLER, W. K., RAKOWSKI, R. F. & SCHNEIDER, M. F. (1976): Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. J. Physiol. 254, 285 - 316

CHAPMAN, R.A. & MILLER, D.J. (1974 a): The effects of caffeine on the contraction of the frog heart. J. Physiol. 242, 589 - 613

CHAPMAN, R.A. & MILLER, D.J. (1974 b): Structure-activity relations for caffeine: a comparative study of the inotropic effects of the methylxanthines, imidazoles and related compounds on the frog's heart. J. Physiol. 242, 615 - 634

CHISTOVA, E.A. (1959): Tables of Bessel functions of the true argument and of integrals derived from them. Pergamon Press, New York

COLLINS, J. H., GREASER, M.L., POTTER, J. D. & HORN, M.J. (1977): Determination of the amino acid sequence of troponin C from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 252, 6356 - 6362

COSTANTIN, L. L. (1970): The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers. J. Gen. Physiol. 55, 703 - 715

COSTANTIN, L. L. & PODOLSKY, R. J. (1966): Evidence for depolarization of the internal membrane system in activation of frog semitendinosus muscle. Nature 210, 483 - 486

COSTANTIN, L. L. & PODOLSKY, R. J. (1967): Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 50, 1101 - 1124

COSTANTIN, L. L. & TAYLOR, S. R. (1973): Graded activation in frog muscle fibers. J. Gen. Physiol. 61, 424 - 443

CRANK, J. (1975): The Mathematics of Diffusion. 2nd Edn. Clarendon Press, Oxford

D'ANS, J. & LAX, E. (1967): Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Bd. 1. Springer Verlag, Berlin

DE MEIS, L. & VIANNA, A. L. (1979): Energy interconversion by the $Ca^{2+}$-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biochem. 48, 275 - 292

DONALDSON, S. K. B. & KERRICK, W. G. L. (1975): Characterization of the effects of $Mg^{2+}$ on $Ca^{2+}$- and $Sr^{2+}$-activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. J. Gen. Physiol. 66, 427 - 444

EBASHI, S. (1980): Regulation of muscle contraction. Proc. R. Soc. Lond. B 207, 259 - 286

EBASHI, S., ENDO, M. & OHTSUKI, I. (1969): Control of muscle contraction. Quart. Rev. Biophys. 2, 351 - 384

EISENBERG, S. & GREENE, L. E. (1980): The relation of muscle biochemistry to muscle physiology. Ann. Rev. Physiol. 42, 293 - 309

ENDO, M. (1972): Stretch-induced increase of activation of skinned muscle fibres by calcium. Nature 237, 211 - 213

ENDO, M. (1975 a): Conditions required for caldium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. Proc. Japan Acad. 51, 467 - 472

ENDO, M. (1975 b): Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Proc. Japan Acad. 51, 479 - 484

ENDO, M. (1977): Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 57, 71 - 108

ENDO, M. & BLINKS, J. R. (1973): Inconstant association of aequorin luminescence with tension during calcium release in skinned muscle fibres. Nature 246, 218-221

ENDO, M. & NAKAJIMA , Y. (1973): Release of calcium induced by "depolarisation" of the sarcoplasmic reticulum membrane. Nature 246, 216-218

ENDO, M., TANAKA, M. & EBASHI, S. (1968): Release of calcium from sarcoplasmic reticulum in skinned fibers of the frog. Proc. Intern. Congr. Physiol. Sci. 24th, Vol. 7, p 126

ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970): Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. Nature 228, 34 - 36

ENDO, M. & THORENS, S. (1975 a): Mechanism of release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. In: Calcium Transport in Contraction and Secretion. (Eds. E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski & A. Margreth). Am. Elsevier, New York, pp 359 - 366

ENDO, M. & THORENS, S. (1975 b): Release of calcium from the sarcoplasmic reticulum induced by hypotonic solutions. J. Physiol. Soc. Japan 37, 422 - 424

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1975): Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. J. Gen. Physiol. 72, 667 - 699

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1977): Variations of the membrane potential of the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle detected with a potential-sensitive dye. J. Gen. Physiol. 70, 6 a

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 a): Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. Ann. NY Acad. Sci. 307, 491 - 522

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 b): Cyclic AMP-induced enhancement of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum with no modification of the sensitivity of the myofilaments to calcium in skinned fibres from a fast skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 539, 253-260

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1979 a): Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol. 41, 473 - 484

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1979 b): Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate $Ca^{2+}$ -induced release of $Ca^{2+}$ from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. Nature 281, 146 - 148

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1979c):Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J. Physiol., Paris, 75, 463-505

FISCHMAN, D.A. & SWAN, R.C. (1967): Nickel substitution for calcium in excitation-contraction coupling of skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 50, 1709 - 1728

FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1968): Force development and calcium movements in skinned muscle fibers. Federation Proc. 27, 375

FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1970): Regenerative calcium release within muscle cells. Science 167, 58 - 59

FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1972 a): Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions. J. Physiol. 223, 1-19

FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1972 b): Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres. J. Physiol. 223, 21 - 33

FORD, L. E., SPOTNITZ, A. J. & SONNENBLICK, E. H. (1970): Coupling between ionic stimulation and contraction of skeletal muscle cells. J. Gen. Physiol. 55, 138

FRANZINI-ARMSTRONG,C. (1980): Structure of sarcoplasmic reticulum. Fedn. Proc. 39, 2403 - 2409

FUCHS, F. (1974): Chemical properties of the calcium receptor site of troponin as determined from binding studies. In: Calcium Binding Proteins (Eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska & E. Carafoli). Elsevier, Amsterdam. pp 1 - 27

GILLIS, J.M. & GERDAY, C. (1977): Calcium movement between myofibrils, parvalbumins and sarcoplasmic reticulum in muscle. In: Calcium-Binding Proteins and Calcium Function (Eds. R.H. Wasserman, R.A. Corradino, E. Carafoli, R.H. Kretsinger, D.H. Mac Lennan & F.L. Siegel). North-Holland, New York, pp 193 - 196

GLASSTONE, S. (1946): Textbook of Physical Chemistry. Second Edition. Mac Millan & Co. Ltd., London

GODT, R. E. (1974): Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration. J. Gen. Physiol. 63, 722 - 739

GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., CONNOLLY, T.N., IZAWA, S. & SINGH, R.M.M. (1966): Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5, 467 - 477

GOSSELIN-REY, C. & GERDAY, C. (1977): Parvalbumins from frog skeletal muscle (Rana temporaria L.). Isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta 492, 53 - 63

GRABAREK, Z. GRABAREK, J., GERGELY, J. & LEAVIS, P. C. (1981): Cooperative interactions in the $Ca^{2+}$-dependent activation of actomyosin ATPase. Biophys. J. 33, 147 a

GRIFFITHS, P.J., KUHN, H.J., GÜTH, R. & RÜEGG, J. C. (1979): Rate of isometric tension development in relation to calcium binding of skinned muscle fibres. Pflügers Arch. 382, 165 - 170

HAINAUT, K. & DESMEDT, J. E. (1974): Effect of dantrolene sodium on calcium movements in single muscle fibres. Nature 252, 728 - 730

HARAFUJI, H. & OGAWA, Y. (1980): Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis (ß-aminoethyl ether)-N,N,N´,N´-tetraacetic acid with calcium around neutral pH. J. Biochem. 87, 1305 - 1312

HARTSHORNE, D.J. & BOUCHER, L.J. (1972): Calcium and the control of muscle activity. In: Hibernation and Hypothermia: Perspectives and Challenges (Eds. F.E. South, J.P. Hannon, J.R. Willis, E.T. Pengelley & N.R. Alpert). Elsevier, Amsterdam. pp 357 - 371

HARTSHORNE, D.J. & BOUCHER, L.J. (1974): Ion binding by troponin. In: Calcium Binding Proteins (Eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska & E. Carafoli). Elsevier, Amsterdam. pp 29 - 49

HASELGROVE, J. C. (1973): X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 341 - 352

HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. (1961): Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. Biochem. Z. 333, 518 - 528

HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. (1963): Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des sarkoplasmatischen Reticulums. Biochem. Z. 339, 94 - 111

HEILBRUNN, L. V. & WIERCINSKI, F. J. (1947): The action of various cations on muscle protoplasm. J. Cell. Comp. Physiol. 29, 15 - 29

HELFFERICH, F. (1959): Ionenaustauscher. Bd. 1. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

HELLAM, D. C. & PODOLSKY, R. J. (1969): Force measurements in skinned muscle fibres. J. Physiol. 200, 807-819

HODGKIN, A. L. & HOROWICZ, P. (1960a):Potassium contractures in single muscle fibres. J. Physiol. 153, 386-403

HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1960 b): The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibres. J. Physiol. 153, 404 - 412

HOWELL, S., JONES, D. A. & MAYOR, S. J. (1981): The action of caffeine and related compounds on skeletal muscle. J. Physiol. 317, 24 - 25P

HÖRL, W.H. & HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1978): Evidence for the participation of a $Ca^{2+}$-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the regulation of the $Ca^{2+}$-transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 2. Effect of phosphorylase kinase and phosphorylase phosphatase. Biochem. 17, 766 - 772

HÖRL, W.H., JENNISSEN, H.P. & HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1978): Evidence for the participation of a $Ca^{2+}$-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the regulation of the $Ca^{2+}$-transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 1. Effect of inhibitors of the $Ca^{2+}$-dependent protein kinase and protein phosphatase. Biochem. 17, 759 - 765

HUXLEY, A. F. (1957): Muscle Structure and theories of contraction Progr. Biophys. Biophys. Chem. 7, 255 - 318

HUXLEY, A. F. (1974): Muscular Contraction. J. Physiol. 243, 1 - 43

HUXLEY, A. F. & TAYLOR, R. E. (1958): Local activation of striated muscle fibres. J. Physiol. 144, 426-441

HUXLEY, A. F. & SIMMONS, R. M (1971): Proposed mechanism of force generation in striated muscle. Nature 233, 533 - 538

HUXLEY, A. F. & SIMMONS, R. M. (1972): Mechanical transients and the origin of muscular force. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. 37, 669 - 680

HUXLEY, H. E. (1973): Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 361 - 376

JOHNSON, F. H. & SHIMOMURA, O. (1978): Introduction to the bioluminescence of medusae, with special reference to the photoprotein aequorin. In: Methods in Enzymology, Vol. 57 (Ed. M. A. De Luca). Academic Press, New York. pp 271 - 291

JOHNSON, J. D., CHARLTON, S. C. & POTTER, J. D. (1979): A fluorescence stopped flow analysis of $Ca^{2+}$ exchange with troponin C. J. Biol. Chem. 254, 3497 - 3502

JORGENSEN, A. O., KALNINS, V. & MAC LENNAN, D. H. (1979): Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. J. Cell. Biol. 80, 372 - 384

JOST, W. (1960): Diffusion in Solids, Liquids, Gases. Academic Press, New York

JULIAN, F. J. (1971): The effect of calcium ion on the force-velocity relation of briefly glycerinated frog muscle fibres. J. Physiol. 218, 117 - 145

KANAZAWA, T., YAMADA, S., YAMAMOTO, T. & TONOMURA, Y. (1971): Reaction mechanism of the $Ca^{2+}$-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. V. Vectorial requirements for calcium and magnesium ions of three partial reactions of ATPase: formation and decomposition of a phosphorylated intermediate and ATP-formation from ADP and the intermediate. J. Biochem. 70, 95 - 123

KATZ, B. (1966): Nerve, muscle, and synapse. McGraw-Hill Book Company, New York

KERRICK, W. G. L., MALENCIK, D. A., HOAR, P. E., POTTER, J. D., COBY, R. L., POCINWONG, S. & FISCHER, E. H. (1980): $Ca^{2+}$ and $Sr^{2+}$ activation: Comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. Pflügers Arch. 386, 207 - 213

KIRCHBERGER, M. A. & TADA, M. (1976): Effects of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. J. Biol. Chem. 251, 725 - 729

KIRCHBERGER, M. A. & RAFFO, A. (1977): Phosphoprotein phosphatase-catalyzed dephosphorylation of the 22,000 dalton phosphoprotein of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 45 - 53

KOHAMA, K. (1980): Role of the high affinity Ca binding sites of cardiac and fast skeletal troponins. J. Biochem. 88, 591 - 599

KOSHLAND, D.E., Jr. (1970): The molecular basis for enzyme regulation. In: The Enzymes, Vol. 1, 3. Ed. (Ed. P.D. Boyer). Academic Press, New York. pp 341 - 396

KRETSINGER, R.H. (1976): Calcium-binding proteins. Annu. Rev. Biochem. 45, 239 - 266

KRETSINGER, R.H., MOEWS, P.C., COFFEE, C.J. & BRADSHAW, R.A. (1974): The coordination of calcium ions by carp muscle calcium binding protein. In: Calcium Binding Proteins (Eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska & E. Carafoli). Elsevier, Amsterdam. pp 703 - 720

KUSHMERICK, M. J. & PODOLSKY, R. J. (1969): Ionic mobility in muscle cells. Science 166, 1297 - 1298

LAU, Y.H., CASWELL, A.H. & BRUNSCHWIG, J.-P. (1977): Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. J. Biol. Chem. 252, 5565 - 5574

LEAVIS, P. C., ROSENFELD, S. S., GERGELY, J., GRABAREK, Z. & DRABIKOWSKI, W. (1978): Proteolytic fragments of troponin C. J. Biol. Chem. 253, 5452 - 5459

LEHMAN, W. (1978): Thick-filament-linked calcium regulation in vertebrate striated muscle. Nature 274, 80 - 81

LEHMAN, W. & SZENT-GYÖRGYI, A. G. (1975): Regulation of muscular contraction, distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom. J. Gen. Physiol. 66, 1 - 30

LÜTTGAU, H. C. & GLITSCH, H. (1976): Membrane physiology of nerve and muscle fibres. Fortschr. Zool., 24, 1 - 132

LÜTTGAU, H. C. & MOISESCU, D. G. (1978): Ion movements in skeletal muscle in relation to the activation of contraction. In: Physiology of Membrane Disorders (Eds. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman & D. D. Fanestil) Plenum Publish. Corp., pp 493 - 515

LÜTTGAU, H.C. & OETLIKER, H. (1968): The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. J. Physiol. 194, 51 - 74

LÜTTGAU, H. C. & SPIECKER, W. (1979): The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. J. Physiol. 296, 411-429

LYMN, R. W. & TAYLOR, E. W. (1971): Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochem. 10, 4617-4624

MAC LENNAN, D. H. & HOLLAND, P. C. (1975): Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 377 - 404

MANNING, D.R. & STULL, J.T. (1979): Myosin light chain phosphorylation and phosphorylase a activity in rat extensor digitorum longus muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 164 - 170

MELZER, W. (1980): Die Aktivierung von Branchiostoma Lanceolatum. Dissertation, Abt. für Biologie, Ruhr-Universität Bochum

MARSTON, S. (1973): The nucleotide complexes of myosin in glycerol-extracted muscle fibres. Biochim. Biophys. Acta 305, 397- 412

MATSUBARA, S., SAKAI, T. & HASHIZUME, K. (1977): Chloride-induced contraction in a skinned fiber of toad striated muscle. Jap. J. Physiol. 27, 501 - 509

MATSUMURA, M. & MASHIMA, H. (1976): Contraction produced by intracellular injection of calcium, strontium, and barium in the single crayfish muscle fibres. Jap. J. Physiol. 26, 145 - 157

MEISSNER, G. (1975): Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta 389, 51 - 68

MEISSNER, G. & McKINLEY, D. (1976): Permeability of sarcoplasmic reticulum membrane. The effect of changed ionic environments on $Ca^{2+}$-release. J. Membr. Biol. 30, 79 - 98

MERMIER, P. & HASSELBACH, W. (1976): Comparison between strontium and calcium uptake by the fragmented sarcoplasmic reticulum. European J. Biochem. 69, 79 - 86

MILLER, D. J. & MOISESCU, D. G. (1976): The effects of very low external calcium and sodium concentrations on cardiac contractile strength and calcium-sodium antagonism. J. Physiol. 259, 283 - 308

MILLER, D. J. & THIELECZEK, R. (1977): Calcium release by caffeine and other methylxanthines in skinned skeletal muscle fibres. J. Physiol. 273, 67 P - 68 P

MOBLEY, B. A. (1979): Chloride and osmotic contractures in skinned frog muscle fibers. J. Membr. Biol. 46, 315 - 329

MOBLEY, B. A. & EISENBERG, B. R. (1975): Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. J. Gen. Physiol. 66, 31 - 45

MOISESCU, D. G. (1975): The effect of $[K^+]$ on the calcium-induced development of tension in isolated bundles of myofibrils. Pflügers Arch. 355, R 62

MOISESCU, D. G. (1976): Kinetics of reaction in calcium-activated skinned muscle fibres. Nature 262, 610 - 613

MOISESCU, D. G., ASHLEY, C. C. & CAMPBELL, A. K. (1975): Comparative aspects of the calcium-sensitive photoproteins aequorin and obelin. Biochim. Biophys. Acta 396, 133 - 140

MOISESCU, D.G. & PUSCH, H. (1975): A pH-metric method for the determination of the relative concentration of calcium to EGTA. Pflügers Arch. 355, R 122

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1978 a): Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution. J. Physiol. 275, 241 - 262

MOISESCU, D. G. & THIELECZEK, R. (1978 b): Arthropod skeletal muscles-insensitive to $Sr^{2+}$. Proc. Aus. Physiol. Pharmacol. Soc. 9, 158 P

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979): Sarcomer length effects on the $Sr^{2+}$- and $Ca^{2+}$-activation curves in skinned frog muscle fibres. Biochim. Biophys. Acta, 546, 64 - 76

MOSS, R.L. (1979): Sarcomere length-tension relations of frog skinned muscle fibres during calcium activation at short lengths. J. Physiol. 292, 177 - 192

NATORI, R. (1954): The property and contraction process of isolated myofibrils. Jikeikai Med. J. 1, 119 - 126

NATORI, R. (1965): Effects of Na and Ca ions on the excitability of isolated myofibrils. In: Molecular Biology of Muscular Contraction (Eds. S. Ebashi, F. Oosawa, T. Sekine & Y. Tonomura). Elsevier, Amsterdam, Vol. 9, pp. 190 - 196

NATORI, R. (1975): The electric potential change of internal membrane during propagation of contraction in skinned fibre of toad skeletal muscle. Japan. J. Physiol. 25, 51 - 63

OGAWA, Y. (1968): The apparent binding constant of glycoletherdiaminetetraacetic acid for calcium at neutral pH. J. Biochem. 64, 255 - 257

OGAWA, Y. (1970): Some properties of frog fragmented sarcoplasmic reticulum with particular reference to its response to caffeine J. Biochem. 67, 667 - 683

OGAWA, Y., KUREBAYASHI, N., IRIMAJIRI, A. & HANAI, T. (1981): Transient kinetics for Ca uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle with reference to the rate of relaxation of living muscle. Adv. Physiol. Sci. Vol. 5. Molecular and Cellular Aspects of Muscle Function. (Eds. E. Varga, A. Köver, T. Kovacs & L. Kovacs). Akadémiai Kiadó, Budapest. pp 417 - 435

ORENTLICHER, M., BRANDT, P.W. & REUBEN, J.P. (1977): Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. Am. J. Physiol. 233, C127 - C134

ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. & BRANDT, P.W. (1974): Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibers. J. Gen. Physiol. 63, 168 - 186

PEACHEY, L. D. (1965): The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. J. Cell. Biol. 25, 209 - 231

PEACHEY, L. D. & EISENBERG, B. R. (1978): Helicoids in the T-System and striations of frog skeletal muscle fibres seen by high voltage electron microscopy. Biophys. J. 22, 145 - 154

PECHÈRE, J.-F. (1977): The significance of parvalbumins among muscular calciproteins. In: Calcium-Binding Proteins and Calcium Function (Eds. R.H. Wasserman, R.A. Corradino, E. Carafoli, R.H. Kretsinger, D.H. Mac Lennan & F.L. Siegel). North-Holland, New York. pp 213 - 221

PERRY, S. V. (1979): The regulation of contractile activity in muscle. Biochem. Soc. Trans. 7, 593 - 617

PORTZEHL, H., CALDWELL, P. C. & RÜEGG, J. C. (1964): Calcium and the contraction of crab muscle fibres. Biochim. Biophys. Acta 79, 581 - 591

POTTER, J. D. & GERGELY, J. (1975): The Calcium and magnesium-binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 4628 - 4633

POTTER, J. D., JOHNSON, J. D., DEDMAN, J. R., SCHREIBER, W. E., MANDEL, F., JACKSON, R. L. & MEANS, A. R. (1977): Calcium binding proteins: relationship of binding, structure, conformation and biological function. In: Calcium-Binding Proteins and Calcium Function (Eds. R. H. Wasserman, R. A. Corradino, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. Mac Lennan & F. L. Siegel). North-Holland, New York, pp 239 - 250

REUBEN, J. P., BRANDT, P. W. & GRUNDFEST, H. (1974): Regulation of myoplasmic calcium concentration in intact crayfish muscle fibers. J. Mechanochem. Cell Motility 2, 269 - 285

ROBERTSON, S. P., JOHNSON, J. D. & POTTER, J. D. (1981): The time-course of $Ca^{2+}$ exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in $Ca^{2+}$. Biophys. J. 34, 559 - 569

ROBERTSON, S.P. & KERRICK, W.G.L. (1979): The effects of pH on $Ca^{2+}$-activated force in frog skeletal muscle fibers. Pflügers Arch. 380, 41 - 45

ROBINSON, R. A. & STOKES, D. (1959): Electrolyte Solutions. Butterworths, London

RODIGUIN, N.M. & RODIGUINA, E.N. (1964): Consecutive Chemical Reactions. D. Van Nostrand Comp., New Jersey

SAKS, V.A., ROSENSTRAUKH, L.V., SMIRNOV, V.N. & CHAZOV, E.I. (1978): Role of creatine-phosphokinase in cellular function and metabolism. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 56, 691 - 706

SANCHEZ, J. A. & STEFANI, E. (1978): Inward calcium current in twitch fibres of the frog. J. Physiol. 283, 197-209

SANDOW, A. (1965): Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Pharmacol. Rev. 17, 265 - 320

SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973): Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. Nature 242, 244-246

SCHWARZENBACH, G. (1960): Die komplexometrische Titration. F. Enke Verlag, Stuttgart

SCHWARTZ, A., ENTMAN, M. L., KANIIKE, K., LANE, L. K., VAN WINKLE, W. B. & BORNET, E. P. (1976): The rate of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle and skeletal muscle. Effects of cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylase b kinase. Biochim. Biophys. Acta 426, 57 - 72

SEYMOUR, J. & O'BRIEN, E. J. (1980): The position of tropomyosin in muscle thin filaments. Nature 283, 680 - 682

SILLEN, L. G. & MARTELL, A. E. (1964): Stability Constants of Metal-ion Complexes. Special Publication No. 17. The Chemical Society, London

SILLEN, L. G. & MARTELL, A. E. (1970): Stability Constants of Metal-ion Complexes. Supplement 1. Special Publication No. 25. The Chemical Society, London

SLEEP, J. A. & SMITH, S. J. (1981): Actomyosin ATPase and muscle contraction. In: Current Topics in Bioenergetics, Vol. 11 (Ed. D. R. Sanadi). Academic Press, New York, pp 239 - 286

SOLARO, R. J. & SHINER, J. S. (1976): Modulation of $Ca^{2+}$ control of dog and rabbit cardiac myofibrils by $Mg^{2+}$. Circ. Res. 39, 8 - 14

SOMLYO, A.V., SHUMAN, H. & SOMLYO, A.P. (1977): Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis. Nature 268, 556 - 558

SPIECKER, W., MELZER, W. & LÜTTGAU, H.C. (1979): Extracellular $Ca^{2+}$ and excitation-contraction coupling. Nature 280, 158 - 160

STEPHENSON, E. W. (1978): Properties of chloride-stimulated $^{45}Ca$ flux in skinned muscle fibers. J. Gen. Physiol. 71, 411 - 430

STEPHENSON, E. W. (1979): Influence of EGTA on stimulated $^{45}Ca$ efflux from skinned muscle fibers. Biophys. J. 25, 141 a

STEPHENSON, E. W. (1981 a): Activation of fast skeletal muscle: Contribution of studies on skinned fibres. Am. J. Physiol. 240, C 1 - C 19

STEPHENSON, E. W. (1981 b): $Ca^{2+}$ dependence of stimulated $^{45}Ca$ efflux in skinned muscle fibres. J. Gen. Physiol. 77, 419 - 443

STEPHENSON, E. W. & PODOLSKY, R. J. (1977 a): Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers. J. Gen. Physiol. 69, 1 - 16

STEPHENSON, E. W. & PODOLSKY, R. J. (1977 b): Influence of magnesium on chloride-induced calcium release in skinned muscle fibers. J. Gen. Physiol. 69, 17 - 35

STEPHENSON, E. W. & PODOLSKY, R. J. (1978): The regulation of calcium in skeletal muscle. Ann. NY Acad. Sci. 307, 462 - 476

STEPHENSON, D.G. & FORREST, Q.G. (1980): Different isometric force-$[Ca^{2+}]$ relationships in slow and fast twitch skinned muscle fibres of the rat. Biochim. Biophys. Acta 589, 358-362

STEPHENSON, D.G., WENDT, I.R. & FORREST, Q.G. (1981): Non-uniform ion distributions and electrical potentials in sarcoplasmic regions of skeletal muscle fibres. Nature 289, 690-692

STEPHENSON, D.G. & WILLIAMS, D.A. (1980): Activation of skinned arthropod muscle fibres by $Ca^{2+}$ and $Sr^{2+}$. J. Muscle Res. Cell Mot. 1, 73 - 87

STEPHENSON, D.G. & WILLIAMS, D.A. (1981): Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. J. Physol. 317, 281 - 302

STULL, J. T., MANNING, D. R., HIGH, C. W. & BLUMENTHAL, D. K. (1980) Phosphorylation of contractile proteins in heart and skeletal muscle. Fedn. Proc. 39, 1552 - 1557

SUAREZ-KURTZ, G. & PARKER, I. (1977): Birefringence signals and calcium transients in skeletal muscle. Nature 270, 746 - 748

SUAREZ-KURTZ, G. & SORENSON, A. L. (1979): Dissociation of action potentials from contraction in single crab muscle fibers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3029 - 3030

TADA, M., KIRCHBERGER, M. A., REPKE, D. I. & KATZ, A. M. (1974): Stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 249, 6174 - 6180

TADA, M., YAMAMOTO, T. & TONOMURA, Y. (1978): Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 58, 1 - 79

TAYLOR, E. W. (1979): Mechanism of actomyosin ATPase and the problem of muscle contraction. Crit. Rev. Biochem. 6, 103 - 164

THIELECZEK, R. (1977): $Sr^{++}$-induzierte Spannungsentwicklung in isolierten Myofibrillenbündeln von Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum, Institut f. Zellphysiologie

THORENS, S. & ENDO, M. (1975): Calcium-induced calcium release and "depolarization"-induced calcium release: their physiological significance. Proc. Japan. Acad. 51, 473 - 478

TONOMURA, Y. (1973): Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport. Univ. Park Press, Baltimore

TSIEN, R.W. (1974): Mode of action of chronotropic agents in cardiac Purkinje fibers. J. Gen. Physiol. 64, 320 - 342

VERGARA, J., BEZANILLA, F. & SALZBERG, B. M (1978): Nile Blue fluorescence signals from cut single muscle fibers under voltage or current clamp conditions. J. Gen. Physiol. 72, 775 - 800

WALLIMANN, T., TURNER, D.C. & EPPENBERGER, H.M. (1977): Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle. J. Cell Biol. 75, 297 - 317

WEBER, A. (1971 a): Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum. I. The effect of accumulated calcium on transport and adenosine triphosphate hydrolysis. J. Gen. Physiol. 57, 50 - 63

WEBER, A. (1971 b): Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented sarcoplasmic reticulum. II. Inhibition of outflux in calcium-free media. J. Gen. Physiol. 57, 64 - 70

WEBER, A. & HERZ, R. (1968): The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J. Gen. Physiol. 52, 750 - 759

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1963): On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 46, 679 - 702

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1966): Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. Biochem. Z. 345, 329 - 369

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1969): The role of magnesium in the relaxation of myofibrils. Biochem. 8, 2266 - 2270

WEBER, A. & MURRAY, J. M. (1973): Molecular control mechanisms in muscle contraction. Physiol. Rev. 53, 612 - 673

WILLIAMS, R.J.P. (1977): Calcium chemistry and its relation to protein binding. In: Calcium-Binding Proteins and Calcium Function (Eds. R. H. Wasserman , R. A. Corradino, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. Mac Lennan & F. L. Siegel). North-Holland, New York, pp 3 - 12

WINEGRAD, S. (1965 a): Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 48, 455 - 479

WINEGRAD, S. (1965 b): The location of muscle calcium with respect to the myofibrils. J. Gen. Physiol. 48, 997 - 1002

WINTER, M.R.C., HEAD, J.F. & PERRY, S.V. (1974): Conformational changes and complex formation by troponin C. In: Calcium Binding Proteins (Eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska & E. Carafoli). Elsevier, Amsterdam. pp 109 - 127

WRAY, H. L., GRAY, R. R. & OLSSON, R. A. (1973): Cyclic adenosine 3 5 monophosphate-stimulated protein kinase and a substrate associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 248, 1496 - 1498

YAMADA, S. & TONOMURA, Y. (1972): Reaction mechanism of the $Ca^{2+}$ dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle VII. Recognition and release of $Ca^{2+}$-ions. J. Biochem. 72, 417 - 425

YAMAMOTO, T. & TONOMURA, Y. (1967): Reaction mechanism of the $Ca^{2+}$-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. J. Biochem. 62, 558 - 575

YAMAMOTO, T. & TONOMURA, Y. (1968): Reaction mechanism of the $Ca^{2+}$-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. J. Biochem. 64, 137 - 145

ZACHAR, J. (1971): Electrogenesis and contractility in skeletal muscle cells. University Park Press, Baltimore

Ich danke Herrn Professor H. Ch. Lüttgau für seine langfristige Unterstützung und Geduld und Herrn Dr. D. G. Stephenson für viele nützliche Vorschläge. Für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit danke ich meinen Kollegen, insbes. Dr. Erich Wettwer und Frau H. Uppenkamp.

Nicht zuletzt danke ich der Friedrich-Ebert-Stiftung für die finanzielle und ideelle Förderung durch ein Promotionsstipendium.

## Lebenslauf

| | | |
|---|---|---|
| Geboren am | 21. 5. 1948 | in Recklinghausen |
| Schulbesuch, Berufsausbildung und -tätigkeit | 1954 - 1962 | Volksschule |
| | 1962 - 1965 | Lehre als Technischer Zeichner |
| | 1965 - 1968 | Berufstätigkeit als Technischer Zeichner |
| | 1965 - 1968 | Berufsaufbauschule Gelsenkirchen |
| | 1968 - 1971 | Ruhr-Kolleg Essen |
| | 1971 | Abitur |
| Studium | 1971 - 1977 | Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum |
| | 1977 | Diplom in Biologie |
| | seit 1978 | Dissertation am Institut für Zellphysiologie der Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum |

**D. GRÄBNER**
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791